

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

GUSTAVO SOUZA SANTOS

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DO COBRE EM DUAS ESPÉCIES DE CICLÍDEOS  
(*Geophagus brasiliensis* E *Oreochromis niloticus*) UTILIZANDO MULTI-  
BIOMARCADORES**

CURITIBA

2017

GUSTAVO SOUZA SANTOS

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DO COBRE EM DUAS ESPÉCIES DE CICLÍDEOS  
(*Geophagus brasiliensis* E *Oreochromis niloticus*) UTILIZANDO MULTI-  
BIOMARCADORES**

Tese apresentada ao curso de Pós-Graduação em Ecologia e Conservação, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Ecologia e Conservação.

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Marta Margarete Cestari

CURITIBA

2017

Universidade Federal do Paraná  
Sistema de Bibliotecas

Santos, Gustavo Souza

Avaliação dos efeitos do cobre em duas espécies de ciclídeos  
(*Geophagus brasiliensis* e *Oreochromis niloticus*) utilizando multi-  
biomarcadores. / Gustavo Souza Santos. – Curitiba, 2017.  
116 f.: il. ; 30cm.

Orientadora: Marta Margarete Cestari

Tese (Doutorado) - Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências  
Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Conservação.

1. Peixe. 2. Metais. 3. Peixe - Reprodução. I. Título II. Cestari, Marta  
Margarete III. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências  
Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Conservação.

CDD (20. ed.) 574.5



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
Setor CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
Programa de Pós-Graduação ECOLOGIA E CONSERVAÇÃO

### TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em ECOLOGIA E CONSERVAÇÃO da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da tese de Doutorado de GUSTAVO SOUZA SANTOS intitulada: *Avaliação dos efeitos do cobre em duas espécies de Ciclídeos (Geophagus brasiliensis e Oreochromis niloticus) utilizando multi-biomarcadores.*, após terem inquirido o aluno e realizado a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua Aprovação.

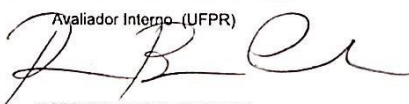
Curitiba, 06 de Março de 2017.


  
MARTA MARGARETE CESTARI

Presidente da Banca Examinadora (UFPR)

  
DANIELA MORAIS LEME  
Avaliador Externo (UFPR)

  
HELENA CRISTINA DA SILVA DE ASSIS  
Avaliador Interno (UFPR)

  
RODRIGO BRASIL CHOUERI  
Avaliador Externo (UNIFESP)

  
IZONETE CRISTINA GUILOSKI  
Avaliador Externo (UFPR)

Dedico esta tese à Deus e  
aos meus pais que são o meu porto seguro.

## **AGRADECIMENTOS**

Primeiramente eu gostaria de agradecer a todos os professores que passaram pela minha vida, saibam que este trabalho possui conhecimento que cada um de vocês me passou.

À minha orientadora Prof. Dr. Marta Margarete Cestari pela amizade, por toda confiança depositada em mim e pelos 8 anos de ensinamentos e muita luta no Laboratório de Mutagênese Ambiental.

Aos professores do programa de pós-graduação em Ecologia e Conservação pelo conhecimento passado sempre da melhor forma possível e toda dedicação em ensinar Ecologia.

À CAPES pelo auxílio da bolsa de estudos durante o doutorado.

Aos técnicos e funcionários da UFPR que sempre se dedicaram para tornar esta Universidade cada dia melhor para os alunos.

Ao Prof. Dr. Robie Allan Bombardelli pela amizade e por ter me aceitado por um tempo no seu laboratório para a realização de parte desta tese.

À Society of Environmental Toxicology and Chemistry por ter me escolhido como representante estudantil durante este último ano, fazendo dele um momento de muito aprendizado para mim.

À Prof. Dr. Helena Cristina Silva de Assis pela amizade e por toda ajuda para realização deste trabalho.

Aos colegas do Laboratório de Citogenética Animal e Mutagênese Ambiental pela amizade e por esses 8 anos de convivência sempre harmoniosa e divertida, em especial aqueles que são partes integrantes da realização deste trabalho, Mario Junior Nadaline e Dr. Flávio Tincani.

Aos colegas do Laboratório de Toxicologia Ambiental pela amizade e por todo esforço no auxílio deste trabalho, em especial a Sabrina Calado.

Aos colegas do Laboratório de Toxicologia Celular pela amizade e auxílio nas análises histopatológicas deste trabalho, em especial a Dr. Ana Carolina Azevedo.

Aos colegas do Instituto de Pesquisa em Aquicultura Ambiental pela amizade e por toda dedicação para que este trabalho desse certo, em especial Cristian Zwetzch e Giovano Neumann.

Ao Prof. Dr. Sandro Xavier Campos e a Cinthia Domingues pelo auxílio nas análises químicas desta tese.

Ao Ednei e Seu Elói pela ajuda na aquisição dos peixes utilizados neste experimento.

Aos colegas da SETAC e Ecotox Brasil por toda amizade e aprendizado nestes últimos anos, que me fizeram entender o quão importante a ecotoxicologia é para o mundo.

Aos meus amigos de coração do DEACO, pessoas mais do que especiais e importantes na minha vida.

Aos meus amigos do Holandês Voador, que me ajudaram a fortalecer o meu plano B de vida que eu sempre quis que fosse o plano A.

À Bruna Rodrigues, meu amor e minha companheira que sempre me ajudou em tudo, me escutou nos momentos mais difíceis e tornou essa jornada mais alegre para mim.

Aos meu pais, Jorge e Maria, que representam tudo na minha vida e que sempre me apoiaram em todas as minhas decisões.

Em memória, a minha avó Zeni e meu avô de coração Seu Centenário, que são as pessoas que eu mais queria que estivessem aqui para viver este momento comigo.

“Se a nossa presença é realmente uma ameaça para a Terra, então nos encontramos em uma posição inusitada de ser, ao mesmo tempo, os agentes da doença e os observadores dos seus efeitos.”

James Lovelock, 2006



## RESUMO

Os efeitos dos metais em organismos aquáticos foram evidenciados no início do século XX, inclusive com o cobre sendo citado nesse período. O cobre é um dos metais mais abundantes na natureza e essencial para o funcionamento do metabolismo dos organismos, pois atua como cofator de enzimas, porém, quando se apresenta em concentrações altas, ele pode ser tóxico. *Geophagus brasiliensis* (nativa) e *Oreochromis niloticus* (invasora) apresentam semelhanças comportamentais e fisiológicas além de apresentarem sobreposição de nichos nos ambientes aquáticos do Brasil. As respostas biológicas destas espécies também têm sido alvo de diversos estudos na área da ecotoxicologia. Dentre estas respostas estão os biomarcadores que são ferramentas utilizadas para avaliar os efeitos de xenobióticos em organismos aquáticos tanto no campo como em laboratório. A genotoxicidade, alterações enzimáticas, alterações histopatológicas e a bioconcentração estão entre os biomarcadores mais utilizados. O objetivo deste trabalho é aplicar a abordagem de biomarcadores em duas espécies para avaliar os efeitos do cobre de níveis sub-individuais e reprodutivos. Para isso foram avaliadas as respostas de multi-biomarcadores referentes as respostas sub-individuais dos peixes como a genotoxicidade, a biotransformação, o estresse oxidativo e as alterações histopatológicas nas duas espécies de ciclídeos expostas ao cobre e sujeitas a vários períodos de depuração; a indução de metalotioneínas em vários tecidos e os danos em macromoléculas de duas espécies de ciclídeos expostas ao cobre e sujeitas a vários períodos de depuração; e os efeitos genotóxicos do cobre em machos de *O. niloticus* relacionando com eventuais alterações na qualidade dos gametas e a geração de anormalidades na prole. De maneira geral, os resultados demonstraram que o cobre pode induzir respostas biológicas distintas nas espécies *G. brasiliensis* e *O. niloticus*, ainda que ambas sejam afetadas pela exposição. Ficou demonstrado que *O. niloticus* ativou praticamente todos os mecanismos enzimáticos relacionados a detoxificação do cobre com o objetivo de reduzir os danos provocados por esta exposição. Também ficou demonstrado como a metalotioneína é induzida nas duas espécies expostas ao cobre. Foi possível correlacionar este metabolismo dependente de metalotioneínas à produção de danos oxidativos em macromoléculas nas duas espécies. Os resultados também demonstraram como os danos no DNA provocados pela exposição ao cobre podem estar relacionados ao prejuízo reprodutivo de *O. niloticus* por meio do aumento de determinadas anormalidades morfológicas larvais.

Palavras-chave: Peixes nativos e exóticos. Metais. Multi-biomarcadores. *Geophagus brasiliensis*. *Oreochromis niloticus*. Danos reprodutivos.

## ABSTRACT

The effects of metals on aquatic organisms were evidenced in the early 20th century, including copper being cited in this period. Copper is one of the most abundant metals in nature and essential for the functioning of the metabolism of organisms, as it acts as a cofactor of enzymes, but when present in high concentrations, it can be toxic. *Geophagus brasiliensis* (native) and *Oreochromis niloticus* (invasive) present behavioral and physiological similarities and present overlap of niches in the aquatic environments of Brazil. The biological responses of these species have also been the subject of several studies in the area of ecotoxicology. Among these responses, the biomarkers are tools to evaluate the effects of xenobiotics on aquatic organisms both in the field and in the laboratory. Genotoxicity, enzymatic changes, histopathological changes and bioconcentration are among the most widely used biomarkers. The objective of this work is to apply the biomarkers approach in two species to evaluate the effects of copper at sub-individual and reproductive levels. For this, we evaluated the multi-biomarkers responses regarding sub-individual responses of fish such as genotoxicity, biotransformation, oxidative stress and histopathological changes in the two species of cichlids exposed to copper and subjected to several purification periods. The induction of metallothioneins in various tissues and the damage to macromolecules of two species of cichlids exposed to copper and subjected to various periods of clearance. Moreover, the genotoxic effects of copper on *O. niloticus* males correlating with eventual changes in gametes quality and generation of offspring abnormalities. In general, the results demonstrated that copper could induce distinct biological responses in species *G. brasiliensis* and *O. niloticus*, with both affected by exposure. *O. niloticus* activated all the enzymatic mechanisms related to copper detoxification in order to reduce the damage caused by this exposure. It has also been demonstrated how metallothionein is induced in the two species exposed to copper. It was possible to correlate this metallothionein-dependent metabolism to the production of oxidative damage in macromolecules in both species. The results also demonstrated how DNA damage caused by exposure to copper might related to the reproductive damage of *O. niloticus* by increasing certain larval morphological abnormalities.

Keywords: Native and invasive fish. Metal. Multi-biomarker. *Geophagus brasiliensis*. *Oreochromis niloticus*. Reproductive impairment.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1 - EXEMPLAR DE <i>Geophagus brasiliensis</i> . FONTE: FISHBASEA (2017). .....	26
FIGURA 2 - EXEMPLAR DE <i>Oreochromis niloticus</i> . FONTE: FISHBASEB (2017)..	28
FIGURA 3 - ÍNDICES BIOMÉTRICOS (FATOR DE CONDIÇÃO E ÍNDICE HEPATOSSOMÁTICO) AVALIADOS EM <i>G. brasiliensis</i> (A-C) E <i>O. niloticus</i> (B-D) EXPOSTOS AO COBRE E SUJEITOS A DEPURAÇÃO. N= 68. ANOVA (MÉDIA ± DP). LETRAS INDICAM DIFERENÇAS SIGNIFICATIVAS ENTRE OS GRUPOS (A, B). ....	49
FIGURA 4 - % DNA NA CAUDA EM SANGUE E FÍGADO DE <i>G. brasiliensis</i> (A-B) E <i>O. niloticus</i> (C-D) AVALIADO PELO ENSAIO COMETA. N=168. ANOVA (MÉDIA ± DP), KRUSKAL-WALLIS (MEDIANA E QUARTIS). LETRAS INDICAM DIFERENÇAS SIGNIFICATIVAS ENTRE OS GRUPOS (A, B). ....	52
FIGURA 5 - ALTERAÇÕES ENZIMÁTICA AVALIADAS EM <i>G. brasiliensis</i> EXPOSTOS AO COBRE E SUJEITOS A DEPURAÇÃO. N=72. ANOVA (MÉDIA ± DP). LETRAS INDICAM DIFERENÇAS SIGNIFICATIVAS ENTRE OS GRUPOS (A, B). ....	53
FIGURA 6 - ALTERAÇÕES ENZIMÁTICA AVALIADAS EM <i>O. niloticus</i> EXPOSTOS AO COBRE E SUJEITOS A DEPURAÇÃO. N=96. ANOVA (MÉDIA ± DP). LETRAS INDICAM DIFERENÇAS SIGNIFICATIVAS ENTRE OS GRUPOS (A, B) .....	53
FIGURA 7 - ANÁLISE DE COMPONENTES PRINCIPAIS (PCA) NOS BIOMARCADORES DO FÍGADO DE <i>G. brasiliensis</i> EXPOSTOS AO COBRE E SUJEITOS A DEPURAÇÃO. ....	55
FIGURA 8 - ANÁLISE DE COMPONENTES PRINCIPAIS (PCA) NOS BIOMARCADORES DO FÍGADO DE <i>O. niloticus</i> EXPOSTOS AO COBRE E SUJEITOS DA DEPURAÇÃO. ....	56
FIGURA 9 – CONCENTRAÇÃO DE METALOTIONEÍNAS NO FÍGADO (A, D), RIM (B, E) E BRÂNQUIAS (C, F) DE <i>G. brasiliensis</i> (A-C) E <i>O. niloticus</i> (D-F) APÓS EXPOSIÇÃO AO COBRE E DEPURAÇÃO. N= 168. ANOVA COM PÓS TESTE DE DUNNETT (MÉDIA ± DP). LETRAS INDICAM DIFERENÇAS SIGNIFICATIVAS ENTRE OS GRUPOS (A, B). ....	71
FIGURA 10 – LIPOPEROXIDAÇÃO AVALIADA EM <i>G. brasiliensis</i> (A) E <i>O. niloticus</i> (B) APÓS EXPOSIÇÃO AO COBRE E DEPURAÇÃO. N= 168. ANOVA COM PÓS	

TESTE DE DUNNETT (MÉDIA $\pm$ DP). LETRAS INDICAM DIFERENÇAS SIGNIFICATIVAS ENTRE OS GRUPOS (A, B). .....	71
FIGURA 11 – CARBONILAÇÃO PROTEICA AVALIADA EM <i>G. brasiliensis</i> (A) E <i>O. niloticus</i> (B) APÓS EXPOSIÇÃO AO COBRE E DEPURAÇÃO. N= 168. ANOVA COM PÓS TESTE DE DUNNETT (MÉDIA $\pm$ DP). LETRAS INDICAM DIFERENÇAS SIGNIFICATIVAS ENTRE OS GRUPOS (A, B). .....	72
FIGURA 12 - ANÁLISE DE COMPONENTES PRINCIPAIS (PCA) NOS BIOMARCADORES DO FÍGADO DE <i>G. brasiliensis</i> EXPOSTOS AO COBRE. ....	73
FIGURA 13 – ANÁLISE DE COMPONENTES PRINCIPAIS (PCA) NOS BIOMARCADORES DO FÍGADO DE <i>O. niloticus</i> EXPOSTOS AO COBRE. ....	74
FIGURA 14 – ANORMALIDADES MORFOLÓGICAS DAS LARVAS DE <i>O. niloticus</i> . LARVA NORMAL (A); LARVA COM DESENVOLVIMENTO ATRASADO (B); EDEMA CARDÍACO (C); CICLOPIA (D); ANORMALIDADES DA MEDULA ESPINHAL (E, F, I); DEFORMIDADES CRANIOFACIAIS (D, F); TRÊS OLHOS (G); TAMANHO REDUZIDO (H). FONTE: O AUTOR .....	86
FIGURA 15 – PARÂMETROS ESPERMÁTICOS AVALIADOS EM <i>O. niloticus</i> EXPOSTOS AO COBRE. VCL=VELOCIDADE CURVILINEAR; VMD=VELOCIDADE MÉDIA DE DESLOCAMENTO E VLR=VELOCIDADE EM LINHA RETA. N = 85 MACHOS. DADOS EXPRESSOS EM MÉDIAS. ....	88
FIGURA 16 – DANOS AO DNA EM SÊMEN (A) E SANGUE (B) DE <i>O. niloticus</i> EXPOSTOS AO COBRE POR 96 HORAS. LETRAS DIFERENTES INDICAM DIFERENÇAS SIGNIFICATIVAS ( $P < 0,05$ ) ENTRE OS GRUPOS (A, B) PELO TESTE ANOVA COM PÓS TESTE DE DUNNETT.....	89
FIGURA 17 – CORRELAÇÃO ENTRE A OCORRÊNCIA DE LARVAS COM (A) DESENVOLVIMENTO ATRASADO E (B) DEFORMIDADES CRANIOFACIAIS RELACIONADAS COM OS DANOS DE DNA NO SÊMEN. ....	90

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – ESTUDOS UTILIZANDO AS ESPÉCIES <i>Geophagus brasiliensis</i> E <i>Oreochromis niloticus</i> COMO BIOINDICADORES DE CONTAMINAÇÃO POR AGENTES TÓXICOS.....	29
TABELA 2 – CONCENTRAÇÃO DE COBRE NO FÍGADO E MÚSCULO DE <i>G. brasiliensis</i> E <i>O. niloticus</i> E NA ÁGUA UTILIZADA NO EXPERIMENTO. ....	50
TABELA 3 – MICRONÚCLEOS E ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS NUCLEARES / 1000 OBSERVADAS EM <i>G. brasiliensis</i> E <i>O. niloticus</i> EXPOSTOS AO SULFATO DE COBRE E SUJEITOS A DEPURAÇÃO.....	51
TABELA 4 - OCORRÊNCIA DE ALTERAÇÕES HISTOPATOLÓGICAS EM <i>G. brasiliensis</i> E <i>O. niloticus</i> EXPOSTOS AO COBRE.....	54
TABELA 5 – CORRELAÇÃO ENTRE OS BIOMARCADORES NO FÍGADO DAS DUAS ESPÉCIES COM OS COMPONENTES DA PCA.....	56
TABELA 6 – CONCENTRAÇÃO DE COBRE NO FÍGADO E MÚSCULO DE <i>G. brasiliensis</i> E <i>O. niloticus</i> EXPOSTOS AO COBRE E SUJEITOS A DEPURAÇÃO. ....	70
TABELA 7 – CORRELAÇÃO ENTRE OS BIOMARCADORES AVALIADOS NAS DUAS ESPÉCIES COM O PRIMEIRO E SEGUNDO COMPONENTES DA PCA. ....	74
TABELA 8 – TAXA DE ANORMALIDADES MORFOLÓGICAS OBSERVADAS NAS LARVAS DE <i>O. niloticus</i> EXPOSTAS AO COBRE. ....	90
TABELA 9 – CONCENTRAÇÃO AFERIDA DE COBRE NO PLASMA DE <i>O. niloticus</i> . ....	91

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ABNT - Associação Brasileira de Normas Técnicas

CASA – Análise Computacional Assistida do Sêmen

CAT – Catalase

CETESB – Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental de São Paulo

CONAMA – Conselho Nacional do Meio Ambiente

DDT – Diclorodifeniltricloroetano

DP – Desvio Padrão

EROD – Etoxiresorufina-O-deetilase

GPx – Glutathione peroxidase

GSH – Glutathione reduzida

GSSG – Glutathione dissulfeto

GST – Glutathione S-transferase

HCG – Gonadotrofina Coriônica Humana

HPA – Hidrocarboneto Policíclico Aromático

IHS – Índice Hepatosomático

LPO – Lipoperoxidação

K – Fator de condição

MT – Metalotioneína

OECD – *Organisation for Economic Co-operation and Development*

PCA – Análise de Componentes Principais

PCO – Carbonilação proteica

POPs – Poluentes Orgânicos Persistentes

SETAC – *Society of Environmental Toxicology and Chemistry*

SOD – Superóxido dismutase

USEPA – *United States Environmental Protection Agency*

VCL – Velocidade Curvilínea

VLR - Velocidade em Linha Reta

VMD - Velocidade Média de Deslocamento

WHO – *World Health Organization*

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b>	15
<b>2 REVISÃO DE LITERATURA</b>	19
2.1 ECOTOXICOLOGIA	19
2.2 ENSAIOS DE DEPURAÇÃO	20
2.3 EFEITOS REPRODUTIVOS	20
2.4 METAIS	21
2.4.1 Cobre	21
2.5 BIOINDICADORES	24
2.5.1 <i>Geophagus brasiliensis</i>	24
2.5.2 <i>Oreochromis niloticus</i>	26
2.6 BIOMARCADORES	32
2.6.1 Genotoxicidade	32
2.6.2 Alterações enzimáticas e estresse oxidativo	34
2.6.3 Histopatologia	38
<b>3 OBJETIVOS</b>	39
3.1 OBJETIVO GERAL	39
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	39
<b>4 CAPÍTULO I</b>	40
4.1 RESUMO	41
4.2 INTRODUÇÃO	41
4.3 MATERIAL E MÉTODOS	43
4.3.1 Desenho experimental	43
4.3.2 Quantificação de cobre	44
4.3.3 Biomarcadores	45
4.3.4 Análise estatística	48
4.4 RESULTADOS	48
4.4.1 Índices biométricos	48
4.4.2 Quantificação de cobre	49
4.4.3 Biomarcadores	50
4.4.4 Abordagem multivariada	54
4.5 DISCUSSÃO	57
4.6 CONCLUSÕES	61
<b>5 CAPÍTULO II</b>	63
5.1 RESUMO	64
5.2 INTRODUÇÃO	64

5.3 MATERIAL E MÉTODOS .....	66
5.3.1 Desenho experimental .....	66
5.3.2 Quantificação de cobre .....	67
5.3.3 Concentração de metalotioneínas.....	67
5.3.4 Lipoperoxidação .....	68
5.3.5 Carbonilação proteica .....	68
5.3.6 Análise estatística .....	68
5.4 RESULTADOS .....	69
5.4.1 Quantificação de cobre .....	69
5.4.2 Concentração de metalotioneínas.....	70
5.4.3 Lipoperoxidação .....	71
5.4.4 Carbonilação proteica .....	72
5.4.5 Análise integrada.....	72
5.5 DISCUSSÃO .....	74
5.6 CONCLUSÕES .....	78
<b>6 CAPÍTULO III .....</b>	<b>79</b>
6.1 RESUMO.....	80
6.2 INTRODUÇÃO .....	80
6.3 MATERIAL E MÉTODOS .....	83
6.3.1 Desenho experimental .....	83
6.3.2 Avaliação espermática .....	84
6.3.3 Fertilização artificial e incubação dos ovos .....	84
6.3.4 Análise dos danos no DNA do sêmen e sangue .....	85
6.3.5 Taxa de eclosão e anormalidades morfológicas das larvas .....	85
6.3.6 Quantificação de cobre no plasma .....	86
6.3.7 Análise estatística .....	87
6.4 RESULTADOS .....	87
6.4.1 Parâmetros espermáticos .....	87
6.4.2 Danos ao DNA do sêmen e sangue .....	88
6.4.3 Taxa de eclosão e anormalidades morfológicas das larvas .....	89
6.4.4 Quantificação de cobre no plasma .....	91
6.5 DISCUSSÃO .....	91
6.6 CONCLUSÕES .....	94
<b>7 CONCLUSÕES GERAIS .....</b>	<b>95</b>
<b>8 CONSIDERAÇÕES FINAIS .....</b>	<b>97</b>
<b>9 REFERÊNCIAS .....</b>	<b>99</b>



## 1 INTRODUÇÃO

A medida que avançamos no tempo se torna mais clara a percepção de que existe uma relação entre as modificações no ambiente natural e a atual crise ambiental observada no mundo. Fritjof Capra (1997) em seu livro “A Teia da Vida” cita que o pensamento isolado dos fenômenos nos restringe a visão sobre o que realmente ocorre na natureza, e que a solução para isso seria o desenvolvimento da visão sistêmica. No entanto, como aplicar esse pensamento “sistêmico” num mundo onde boa parte dos problemas observados apresentam alto nível de complexidade? A compreensão geral dos fenômenos naturais realmente é um desafio, mas o primeiro passo seria segmentar a ciência como um quebra-cabeça, não esquecendo das relações existentes entre cada uma das peças. A montagem deste quebra-cabeça começa pelo desenvolvimento do conhecimento que esteja mais interconectado. E a partir de diversos fragmentos do quebra-cabeça montamos o conhecimento geral que classificamos como “sistêmico”. A ecotoxicologia, tema principal desta tese, age uma peça fundamental deste quebra-cabeça, pois é uma ciência integradora de diversas linhas de conhecimento sobre as relações entre os organismos e o ambiente.

Newman em 2015 definiu a ecotoxicologia como “a ciência dos contaminantes na biosfera e seus efeitos sobre os constituintes desta biosfera, incluindo humanos”, ou seja, qualquer organismo sob o efeito de um agente seja ele de fonte natural ou antrópica é tema de interesse da ecotoxicologia. Não somente os organismos, mas as relações ecológicas que eles apresentam entre si, constituindo populações, comunidades e ecossistemas. Por isso, esta área de estudo abrangente integra grandes áreas da ciência como a Ecologia e a Toxicologia (CHAPMAN, 2002).

É impossível separar as atividades antrópicas das consequências por elas trazidas ao meio ambiente. Em qualquer lugar no mundo, inclusive nos ambientes mais inóspitos, é possível observar organismos de todos níveis da organização sistemática influenciados pela exposição a xenobióticos (WALKER, 2014). Acredita-se que a quantidade de contaminantes despejados nos ambientes aumentou em mais de 100 vezes desde o início do século XX (NRIAGU, 1996). Esse aumento pode ser atribuído tanto a produção de novos compostos como também ao desenvolvimento de técnicas mais precisas para detectar estes compostos no ambiente (GEISSEN et al., 2015).

A *Society of Environmental Toxicology and Chemistry* (SETAC) levantou algumas questões prioritárias no estudo dos efeitos dos xenobióticos sobre a qualidade do ambiente em diferentes áreas geográficas do mundo. Algumas destas questões serão amplamente discutidas nesta tese, como a informação sobre a sensibilidade de espécies regionais a fim de se prever os impactos em ecossistemas locais e a extrapolação dos resultados de testes de toxicidade em espécies utilizadas como regulatórias para os cenários e taxa locais.

A Organização das Nações Unidas pontuou que a gestão sustentável dos recursos naturais é ponto chave no desenvolvimento econômico e social. Um dos objetivos a serem atingidos até 2030 refere-se a redução da poluição pela minimização da liberação de produtos químicos e materiais perigosos, reduzindo à metade a proporção de águas residuais não tratadas e aumentando substancialmente a reciclagem globalmente.

Dentre as classes de xenobióticos mais estudadas ao redor do mundo estão os metais. Os estudos dos efeitos dos metais em organismos aquáticos vêm desde o início do século XX, quando algumas pesquisas detectaram que os metais em determinadas concentrações poderiam apresentar toxicidade e levar estes organismos a morte (MEYER et al., 2007). No entanto, por muitos anos, os estudos a respeito da toxicidade dos metais em organismos aquáticos permaneceram somente na observação da mortalidade e a compreensão dos mecanismos químicos e fisiológicos provenientes desta exposição. No século XXI, com o desenvolvimento de diversas análises integrativas mais sensíveis como os biomarcadores e a aplicação dos estudos ecotoxicológicos em agências regulatórias de todo mundo, este cenário mudou bastante (SANTOS et al., 2017).

Como citado acima, durante o século XX, o principal meio para avaliar e regular os xenobióticos no meio ambiente estava restrito ao desenvolvimento de bioensaios padronizados e monitoramento ambiental rotineiro (SCHLENK et al., 2008). No entanto, após esta época, os toxicologistas voltaram a atenção para o desenvolvimento de análises mais sensíveis e mais integradas. A ideia era agrupar respostas de diversos níveis de organização biológica e que pudessem representar o estado de saúde dos organismos e a qualidade do ambiente. Isto levou ao desenvolvimento dos biomarcadores por meio de análises que levavam em consideração parâmetros hematológicos, histológicos, histoquímicos, metabólicos,

bioquímicos e genéticos para a avaliação dos efeitos dos xenobióticos tanto em trabalhos em campo quanto em laboratórios (VAN DER OOST; BEYER; VERMEULEN, 2003). O uso de biomarcadores em peixes tem sido tema frequente na ecotoxicologia aquática e trouxe novas informações a respeito do potencial tóxico de vários compostos químicos.

Muitos dados a respeito das respostas biológicas dos peixes frente a exposição a metais tem sido discutidos na última década (HAMILTON et al., 2016). Dados a respeito da cinética, aporte e eliminação destes compostos são informações cruciais para o entendimento das prováveis consequências para estes organismos (LUOMA; RAINBOW, 2005). Ensaio de depuração em peixes fornecem informações sobre o metabolismo dos agentes tóxicos e sobre a capacidade de retomada do estado de homeostase após um evento estressante (NEWMAN, 2015). Entretanto, estudos neste sentido são escassos na literatura, e por isso é uma importante abordagem para ser explorada dentro da ecotoxicologia.

Num contexto ecológico, podemos inferir que os agentes tóxicos podem alterar diretamente comunidades de peixes e gerar prejuízo para diversas espécies, principalmente aquelas que apresentam maior sensibilidade (MACEDA-VEIGA; DE SOSTOA, 2011). De forma geral, os peixes sofrem bioacumulação e são capazes de responder a agentes tóxicos em baixas concentrações (VAN DER OOST; BEYER; VERMEULEN, 2003). Por apresentarem alta variabilidade de respostas a esta exposição e grande distribuição ao redor do mundo, os peixes são excelentes preditores desta exposição em ambientes aquáticos (BAE; PARK, 2014). Além dos efeitos em nível sub-individual, os agentes tóxicos podem induzir alterações reprodutivas em peixes, fazendo destes organismos modelos de estudos interessantes para avaliações dos efeitos em níveis mais altos de organização biológica (DEVAUX et al., 2011).

Esta tese está organizada em três capítulos que tratam dos efeitos do cobre sobre as espécies de ciclídeos em contextos diferentes. O Capítulo I investigou as respostas de multi-biomarcadores em duas espécies de ciclídeos expostas ao cobre e sujeitas a vários períodos de depuração. Foram utilizadas várias classes de biomarcadores referentes às respostas sub-individuais dos peixes como a genotoxicidade, a biotransformação, o estresse oxidativo e as alterações histopatológicas. O Capítulo II investigou a indução de metalotioneínas em vários

tecidos e os danos em macromoléculas de duas espécies de ciclídeos expostas ao cobre e sujeitas a vários períodos de depuração. Foi investigado o metabolismo do cobre dependente de metalotioneínas nos peixes e as consequências da exposição em macromoléculas como lipídeos e proteínas. O Capítulo III investigou os efeitos genotóxicos do cobre em machos de *Oreochromis niloticus* relacionando com eventuais alterações na qualidade dos gametas e a geração de anormalidades na prole.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 ECOTOXICOLOGIA

A ecotoxicologia foi definida primeiramente por Truhaut (1977) como “a parte da Toxicologia preocupada com o estudo dos efeitos tóxicos, causados por poluentes naturais e sintéticos, aos constituintes dos ecossistemas, animais (incluindo humanos), vegetais e microbianos, num contexto integrado”. Por isso, a ecotoxicologia é definida como a integração entre a ecologia e a toxicologia (CHAPMAN, 1995). E o principal objetivo desta ciência é compreender e prever os efeitos de xenobióticos em comunidades naturais sob condições realísticas de exposição. E justamente por levar em consideração o contexto ecológico da exposição aos contaminantes, a ecotoxicologia se diferencia da toxicologia ambiental (CHAPMAN, 2002). Dentro deste contexto ecológico podemos citar as interações das espécies entre si e com o meio ambiente, a estruturação de comunidades e as relações tróficas de cada organismo. A toxicologia ambiental se preocupa em conduzir experimentos com organismos modelos para avaliar os possíveis efeitos de um determinado xenobiótico, sendo a significância ecológica colocada em segundo plano (CHAPMAN, 2002). Os estudos ecotoxicológicos agrupam uma sequência de classes de estudos que caracterizam esta ciência. Primeiramente, objetiva-se estudar a entrada dos xenobióticos no meio abiótico, e como eles são distribuídos pelo ecossistema. E por último, caracterizamos este xenobiótico de forma qualitativa e quantitativa, avaliando os efeitos desde o nível sub-individual até os ecossistemas, podendo extrapolar estas conclusões para os efeitos sobre populações humanas (TRUHAUT, 1977).

Podemos citar que o principal marco histórico relacionado ao surgimento da ecotoxicologia é a publicação do livro “Primavera Silenciosa” de Rachel Carson (1962) que denunciou a relação entre o uso indiscriminado do DDT e o declínio da população de espécies de aves nos Estados Unidos. Ocorreram outros marcos importantes dentro desta ciência, como a descoberta da atividade de desregulação endócrina de diversos compostos como citado por Colborn, Myers e Dumanoski (1996) no livro “Nosso futuro roubado” na década de 90, e a aplicação da técnicas ômicas a partir dos anos 2000. No Brasil, a ecotoxicologia começou a ser discutida na década de 80. No entanto, o primeiro Congresso Brasileiro nesta área ocorreu somente em 1991. Hoje a ABNT já tem definida normas para mais de 10 ensaios ecotoxicológicos

diferentes em organismos aquáticos, e que são estabelecidas como padrão de qualidade para estes ambientes no país.

## 2.2 ENSAIOS DE DEPURAÇÃO

Depuração é um termo associado a um desenho experimental específico no qual os organismos são dispostos em um ambiente ausente de contaminação para que seja testada a eliminação dos agentes tóxicos em um determinado período de tempo. Esta abordagem é adequada tanto em laboratório quanto em campo nas quais são testadas as concentrações e os efeitos biológicos durante a eliminação dos contaminantes nos organismos (NEWMAN, 2015).

Quando levamos em consideração estudos de depuração a longo prazo, as respostas obtidas se tornam ainda mais desafiadoras, pois existem poucos estudos elucidando os mecanismos que regulam a eliminação dos agentes tóxicos nestes períodos de tempo. Por exemplo, metais não essenciais como o Cádmio tendem a ser excretados de forma mais rápida do que elementos essenciais (REINFELDER et al., 1998). Alguns metais essenciais como o Zn e o Cu podem apresentar taxas variáveis de eliminação e acumular em tecidos alvos como o fígado e o rim (CLEARWATER; FARAG; MEYER, 2002; DANG; ZHONG; WANG, 2009).

Em ensaios de depuração, o cérebro parece ser preferencialmente protegido contra o acúmulo de muitos metais, provavelmente pela barreira hemato-encefálica (FILIPOVIĆ; RASPOR, 2003). Em contraste, o fígado e rim servem como eliminação e depuração órgãos, geralmente acumulando a maior concentração (SQUADRONE et al., 2013). Tanto o tempo de exposição como a via de exposição alteram substancialmente os padrões de acumulação específicos do tecido. Isto é em parte resultado das diferentes taxas de perfusão tecidual pelo sangue entre os órgãos (VISNJIC-JEFTIC et al., 2010). Durante a exposição crônica e depuração, há muitas vezes uma tendência progressiva ao longo do tempo para níveis de metais estabilizarem ou diminuírem na maioria dos órgãos, porém, eles tendem a aumentar no fígado, rim e esqueleto (GROSELL, 2011).

## 2.3 EFEITOS REPRODUTIVOS

Vários agentes tóxicos liberados nos ambientes aquáticos podem alterar diversos parâmetros reprodutivos nos organismos produzindo consequências importantes nos esforços para a manutenção da biodiversidade (SFAKIANAKIS et al.,

2015). Vários contaminantes podem interferir diretamente na morfologia e na motilidade espermática e, posteriormente, na fertilização (KIME, 1999). Um exemplo é a interação dos agentes tóxicos com os gametas dos organismo que podem obstruir a micróplia, impedindo o processo de fertilização. Por exemplo, alguns metais pode alterar a qualidade dos gametas (LAHNSTEINER; MANSOUR; BERGER, 2004), a fertilização dos oócitos, a motilidade espermática, a eclosão dos ovos e a qualidade das larvas (BOMBARDELLI et al., 2016; WITECK et al., 2011).

A relação entre a sucesso reprodutivo e os danos no DNA tem sido tema de diversos estudos recentes (DEVAUX et al., 2011, 2015; LACAZE et al., 2011a; SANTOS et al., 2013b). A funcionalidade que células germinativas desempenham de propagar o DNA para a próxima geração é diretamente afetado pela perda da integridade do genoma (LACAZE et al., 2011b). Já foi demonstrado que o DNA do espermatozoide pode ser modificado através de vários mecanismos (SAKKAS; ALVAREZ, 2010), e que o dano nesta célula está relacionado à baixa taxa de fertilização, desenvolvimento embrionário defeituoso e mortalidade elevada da prole, quando testada em mamíferos (AITKEN; DE IULIIS, 2007; FATEHI et al., 2006). Os espermatozoides apresentam baixa capacidade de reparo do DNA e defesas antioxidantes limitadas, por isso são mais susceptíveis ao dano do que os oócitos e células somáticas (LACAZE et al., 2011b; LEWIS; GALLOWAY, 2010).

## 2.4 METAIS

### 2.4.1 Cobre

Os efeitos dos metais em organismos aquáticos foram trazidos à tona no início do século XX, com os relatos da toxicidade de determinados sais metálicos em peixes (THOMAS, 1915; WHITE; THOMAS, 1912), inclusive com os efeitos do cobre sendo citados nesse período. O cobre é um dos metais mais abundantes na natureza e essencial para o funcionamento do metabolismo dos organismos agindo como cofator de enzimas relacionadas a defesa antioxidante (superóxido dismutase), a biossíntese de neurotransmissores (dopamina beta-hidroxilase), pigmentação (tirosinase), queratinização (sulfidril oxidase), homeostase de ferro (ceruloplasmina) e apresentando papel importante na respiração celular (citocromo c oxidase) (GROSELL, 2011). No entanto, quando se apresenta em grandes concentrações pode apresentar atividade tóxica e bioacumular nos tecidos (OECD, 2014).

Este metal quando na sua forma mais simples (Cu), apresenta alta condutividade ao calor e à eletricidade e alta maleabilidade, propriedades que conferem a ele diversas funcionalidades importantes na produção de cabos e fios para transmissão elétrica (WHO, 1998). Este metal é solúvel em água quando está formando sais metálicos como o sulfato de cobre e o óxido cuproso, pois na forma de cobre metálico ele é praticamente insolúvel em água (WHO, 1998). Os principais usos do cobre são na forma de cabos para instalações elétricas, canos de água, recipientes para indústrias, pinturas anti-incrustantes, e em materiais de cobertura e revestimento de construções. Alguns sais de cobre também têm sido utilizado como algicida e fungicidas (WHO, 1998). Nestas formas ele é aplicado em sistemas de cultura de peixes em concentrações variando entre 0,3 a 20 mg/L para a eliminação de pragas (NOR, 1987). Esta aplicação tem sido muito eficiente na redução da abundância de algas tóxicas como as do gênero *Microcystis* (CHEN; LIN, 2001). Os níveis de cobre encontrados em ambientes aquáticos sem contaminação são baixos variando de 0,5 a 1 µg/L (MOORE; RAMAMOORTHY, 1984). No entanto, em ambientes com muita influência antrópica, sugere-se um valor máximo de 20 µg/L de cobre como o recomendado para que não afete os organismos aquáticos (USEPA, 2007a). A legislação brasileira através do CONAMA 357/2005 sugere um valor de 13 µg/L em águas de classe III que são aquelas destinadas para o consumo humano. Em ambientes aquáticos próximos a áreas de mineração valores variando entre 100 µg/L a 100 mg/L de cobre já foram encontrados (GROSELL, 2011). Outro exemplo, a CETESB (2015) identificou que 28% dos rios monitorados do estado de São Paulo nos anos de 2009 a 2013 apresentaram concentrações de cobre acima do permitido pelos limites da legislação.

As principais fontes antropogênicas de exposição ao cobre são a mineração, as indústrias, os processos de combustão, o esgoto doméstico e a produção de fertilizantes. No entanto, este metal pode apresentar fontes naturais como a poeira levada pelo vento, vulcões, e os incêndios florestais (GEORGOPOULOS et al., 2001). Esta contaminação tem como destino na grande maioria dos casos o ambiente aquático, onde o cobre pode entrar em contato com a biota. Neste ambiente, o cobre pode ocorrer em dois estados oxidativos, Cu(I) e Cu(II), que apresentam grandes diferenças quanto a biodisponibilidade e transporte deste elemento (BOONE et al., 2012; PHAM et al., 2013). O Cu(I), não se apresenta capacidade de se ligar a matéria



orgânica, diferentemente do Cu(II), gerando diferentes padrões de biodisponibilidade destes estados do cobre (COALE; BRULAND, 1990).

Dentre os efeitos que o cobre pode induzir em peixes estão os danos em proteínas intracelulares, aumento na produção de espécies reativas de oxigênio (KRUMSCHNABEL et al., 2005), indução do p53 (OSTRAKHOVITCH; CHERIAN, 2005), alterações osmorregulatórias (SAGLAM; ATLI; CANLI, 2013), alterações fisiológicas, indução de apoptose (MONTEIRO et al., 2009), além da genotoxicidade (ÇAVAŞ; GARANKO; ARKHIPCHUK, 2005). O cobre também pode agir em órgãos sensoriais que apresentam contato direto com a água como o epitélio olfatório e a linha lateral, alterando o comportamento natatório dos peixes através da fuga e da desorientação do nado (DEFOREST et al., 2011; JOHNSON; CAREW; SLOMAN, 2007). Os efeitos deletérios deste metal sobre vários tipos de tecidos dos peixes já foram descritos, tendo o fígado como o principal alvo destes estudos, porém, este metal já foi detectado em tecidos como o rim, brânquias, músculo, bile e ossos (CLEARWATER et al., 2002; HAUSER-DAVIS et al., 2014; VOIGT et al., 2015). No fígado o cobre se liga à ceruloplasmina e para cair na corrente sanguínea e ser distribuída por todo organismo, alterando o funcionamento e a estrutura de diversas biomoléculas como proteínas e lipídeos, afetando diretamente os padrões de homeostase celular (OECD, 2014; WHO, 1998). No rim, o cobre pode induzir dano oxidativo e alterar a expressão de diversas enzimas (REZK et al., 2009). A brânquia é considerada o principal órgão no aporte de cobre no peixes (JEZIERSKA; WITESKA, 2006), podendo sofrer bioacumulação e alterações estruturais severas (ÇAVAŞ; GARANKO; ARKHIPCHUK, 2005; ÇOGUN; KARGIN, 2004; KALAY; CANLI, 2000; MONTEIRO et al., 2009). Altas concentrações de cobre nas brânquias podem bloquear o aporte de íons pela inibição de enzimas basolaterais dependentes de ATP. A diminuição da concentração de Na<sup>+</sup> e Cl<sup>-</sup> devido ao bloqueio do aporte pelo cobre, pode levar a alterações ionoregulatórias e osmorregulatórias que podem levar o peixe a morte (GROSELL, 2011). Embora os efeitos tóxicos do cobre sejam bem documentados na literatura, a variabilidade das respostas frente a exposição é bastante grande. Isto também se deve aos diferentes mecanismos utilizados para a metabolização do cobre utilizado por diferentes espécies de peixe.

Os peixes ainda apresentam uma necessidade nutricional pelo cobre variando entre 3 a 10 mg Cu/kg do peso seco do alimento, dependendo da espécie, do regime

alimentar e do estágio de vida (REZK et al., 2009). Por exemplo, acredita-se que a espécie *O. niloticus* apresenta uma necessidade de 4mg Cu/kg no alimento (SHIAU; NING, 2003).

## 2.5 BIOINDICADORES

### 2.5.1 *Geophagus brasiliensis*

A espécie de peixe *Geophagus brasiliensis* (Quoy e Gaimard, 1824), popularmente conhecida como Acará, faz parte da família Cichlidae e apresenta ampla distribuição no Brasil (Fig. 1). Esta espécie é naturalmente distribuída desde a bacia Amazônica até a bacia do rio da Prata no sul do Brasil (FISHBASE, 2017a). Ela pode ser encontrada em ambientes lênticos e em estuários (GARCIA et al., 2003). Devido a sua coloração, esta espécie foi introduzida em diversos países como Estados Unidos, Taiwan, Filipinas e Austrália, para a utilização como peixe ornamental em aquários (BEATTY et al., 2013). Os acarás apresentam comportamento solitário, epibentônico, normalmente maior atividade durante o dia e orientação visual (SABINO; CORRÊA-CASTRO, 1990). Ainda, estes peixes apresentam boa tolerância a temperatura e salinidade e são comumente encontradas em ambientes com pH entre 6,8 e 7,2 (BEATTY et al., 2013).

*G. brasiliensis* podem atingir um comprimento máximo 30 cm, e apresentam uma coloração bem característica com manchas azuis espalhadas pelo corpo (CABI, 2017). Os acarás apresentam alta plasticidade trófica e já foram colocadas em diversas categorias (NUNES; ROCHA; VERANI, 2014). Embora na maioria dos estudos eles apresentem alimentação onívora, esta espécie já foi classificada como detritívora–iliófaga e bentívora (NUNES; ROCHA; VERANI, 2014). Estudo sobre o conteúdo estomacal destes peixes demonstrou comportamento predominantemente bentônico, contendo vegetais, detritos, sedimentos, invertebrados aquáticos e escamas de peixe (GOMIERO; BRAGA, 2008). No entanto, a dieta ontogênica desta espécie pode sofrer mudanças para se adaptar a diferentes ambientes (BEATTY et al., 2013). O comportamento alimentar desta espécie foi descrito pela tática alimentar de coleta de substrato e separação da presa (*picking up substrate and sorting prey*), onde peixe projeta a maxila superior para coletar o substrato e expelle o sedimento pela boca e aberturas operculares (ABELHA; GOULART, 2004).

Esta espécie apresenta cuidado parental, hábito de fazer ninhos e tanto o macho quanto a fêmea protegem as larvas dentro da cavidade bucal (SANTOS; FONTOURA, 2000). Os machos atingem a maturação sexual por volta de um ano enquanto as fêmeas atingem após um ano e meio. Durante a época reprodutiva, o casal de peixes cava um ninho no fundo onde a fêmea desova uma média de 16000 óvulos por quilo de peso (SANTOS; FONTOURA, 2000). Estes óvulos após fertilizados demoram em média 96 horas para eclodir numa temperatura de 25 °C, e a larvas medem aproximadamente 0,5 cm (MARDINI, 1983). A defesa das larvas por incubação oral ocorre até que as larvas possuam capacidade de buscar o próprio alimento (SANTOS; FONTOURA, 2000). Outra característica marcante desta espécie é o desenvolvimento de um protuberância carnosa na cabeça do macho durante o período reprodutivo. Acredita-se que esta estrutura esteja relacionada a um depósito de gordura, pois ela desaparece após a época da desova (AMARAL et al., 2011).

É importante constar que esta espécie foi introduzida em diversos países como Estados Unidos e Austrália gerando impacto ecológico para nestes ambientes. O potencial invasor desta espécie é atribuído a dieta oportunista, estratégia reprodutiva prolongada e flexível, habilidade em colonizar tanto ambientes lóticos como lênticos e alta tolerância a variáveis ambientais como a salinidade e a temperatura (BEATTY et al., 2013; MAZZONI; IGLESIAS-RIOS, 2002).

Em ambientes naturais do Brasil, já foi descrito o impacto em populações de *G. brasiliensis* da degradação ambiental pela poluição e a introdução de espécies invasoras como a *O. niloticus* (LINDE et al., 2008). Estas espécies apresentam sobreposição de nichos e por isso competem em ambientes naturais no Brasil (SANCHES et al., 2012).

*G. brasiliensis* também tem sido alvo de diversos estudos envolvendo os efeitos da poluição por diversas classes de xenobióticos. Estes dados estão descritos na Tabela 1.



Figura 1 - Exemplar de *Geophagus brasiliensis*. Fonte: FISHBASEa (2017).

### 2.5.2 *Oreochromis niloticus*

A espécie *Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1758), popularmente conhecida como tilápia do Nilo, faz parte da família Cichlidae e é originária da bacia do rio Nilo na África (TREWAVAS, 1982) (Fig. 2). No entanto, a produção em larga escala desta espécie foi introduzida em diversos países, sendo considerada a segunda espécie de peixe mais consumida do mundo (WATANABE et al., 2002). Esta espécie ocorre em uma ampla gama de habitats de água doce como rios, lagos, canais e planícies de irrigação, apresentando hábito principalmente diurno (BAILEY, 1994). Estes peixes também são adaptados para a produção, sendo facilmente mantidos em pequenas lagoas e em sistemas de alta produção como hapas, gaiolas e tanques (CAMPOS-MENDOZA et al., 2004). Além disso esta espécie sobrevive em ambientes de água salobra e água do mar (KAMAL; MAIR, 2005).

A tilápia pode atingir um tamanho máximo de 60 cm, podendo pesar mais de 4 quilos em linhagens específicas para a produção em larga escala pois naturalmente estes peixes atingem em média 20 cm (FISHBASE, 2017b). Apresenta hábito onívoro e se adapta facilmente a vários tipos de alimentação quando em cativeiro (KHALLAF; ALNE-NA-EI, 1987). Nestas produções em larga escala, a produção se dá através da manutenção de machos e fêmeas em tanques, coletando os ovos da boca das fêmeas e os incubando artificialmente em criadouros (LITTLE; BHUJEL; PHAM, 2003). O comportamento reprodutivo natural destes peixes se assemelha muito ao que foi descrito para *G. brasiliensis*, pois os machos cavam o ninho onde será realizada a oviposição pela fêmea (FESSEHAYE et al., 2006). Já foi descrito que existe muita

competição entre os machos para a montagem deste ninho, visto que os peixes desta espécie apresentam um comportamento mais agressivo (FESSEHAYE et al., 2006). As tilápias além de apresentarem alta fecundidade (colocando milhares de ovos em cada desova), têm capacidade de reprodução durante todo o ano e um período de maturação sexual curto variando de 5 a 6 meses (MORRISON; MIYAKE; WRIGHT, 2001).

O potencial invasor desta espécie é evidente em diversos estudos, e é atribuído principalmente a alta tolerância a variáveis ambientais (ZENGEYA et al., 2013). A introdução da tilápia no Brasil ocorreu na década de 70, quando foi implementado no país um plano para produção de alevinos para o peixamento dos reservatórios públicos no Nordeste. Com isso, outros estados também começaram a adotar a produção destes alevinos, quando a partir de 1980 o cultivo de tilápias se estabeleceu como uma atividade comercial no país (VICENTE; ELIAS; FONSECA-ALVES, 2014). Hoje o Brasil figura entre os países com o maior aumento da produção de tilápia do mundo, atrás da China, Egito, entre outros (VICENTE; ELIAS; FONSECA-ALVES, 2014). Sabe-se também que o aumento de populações de tilápias em ambientes naturais no Brasil, juntamente com o declínio da qualidade ambiental, tem causado prejuízo a outras espécies como o *G. brasiliensis* (LINDE et al., 2008). Estas espécies apresentam semelhanças morfológicas, comportamentais e fisiológicas, inclusive sendo difícil diferenciá-las quando ainda estão em estágio iniciais de vida. Também já foi atribuído a tilápia uma maior tolerância a degradação dos habitats do que outras espécies nativas do Brasil, principalmente nos estágios iniciais da vida, o que faz dela um potencial invasor em vários tipos de ambientes (LINDE et al., 2008).

A espécie *O. niloticus* tem sido bastante utilizada em experimentos, sendo um modelo biológico bastante comum na ecotoxicologia. Estudos com esta espécie que demonstram os efeitos dos xenobióticos abundantes, sendo a grande maioria deles aborda os efeitos ao nível individual (BARBOSA et al., 2010; ÇAVAŞ; ERGENE-GÖZÜKARA, 2003). A Tabela 1 demonstra alguns estudos importantes envolvendo esta espécie e a exposição a xenobióticos. Esta espécie também tem sido alvo de estudos em diversas áreas como a genética molecular (KOCHER et al., 1998), a endocrinologia (KWON et al., 2000), estudos com transgênicos (RAHMAN; MACLEAN, 1992) e fisiologia (BARRETO et al., 2009).



Figura 2 - Exemplar de *Oreochromis niloticus*. Fonte: FISHBASEb (2017).

Tabela 1 – Estudos utilizando as espécies *Geophagus brasiliensis* e *Oreochromis niloticus* como bioindicadores de contaminação por agentes tóxicos.

Espécie	Agente tóxico	Efeitos	Referência
<i>O. niloticus</i>	Cádmio	Alterações fisiológicas e comportamentais	AL-AKEL et al. (1988)
<i>O. niloticus</i>	Cobre	Bioconcentração de cobre	DARAMOLA; OLADIMEJI (1989)
<i>O. niloticus</i>	Chumbo	Mortalidade e Bioconcentração de chumbo nas brânquias, fígado, músculo, intestino e ossos	OLADIMEJI; OFFEM (1989)
<i>O. niloticus</i>	Metais	Bioconcentração de metais e alterações histopatológicas	ONWUMERE; OLADIMEJI (1990)
<i>O. niloticus</i>	Mistura complexa	Estresse oxidativo em brânquias, fígado, eritrócitos e rim	BAINY et al. (1996)
<i>O. niloticus</i>	Atrazina	Alterações fisiológicas e inibição da Acetilcolinesterase	HUSSEIN; EL-NASSER; AHMED (1996)
<i>O. niloticus</i>	Oxifluoreno	Indução da hsp70	HASSANEIN et al. (1999)
<i>G. brasiliensis</i>	Mistura complexa	Alterações em enzimas do sistema antioxidante	WILHELM FILHO et al. (2001)
<i>O. niloticus</i>	Cádmio, Chumbo, Cobre, Zinco e Ferro	Aumento de metalotioneínas	ATLI; CANLI (2003)
<i>O. niloticus</i>	Efluente de indústria têxtil	Danos genéticos	ÇAVAŞ; ERGENE-GÖZÜKARA (2003)
<i>G. brasiliensis</i>	Metais	Bioconcentração no músculo, gônadas e brânquias	CALZA et al. (2004)
<i>O. niloticus</i>	Cobre	Mortalidade e bioconcentração	ÇOGUN; KARGIN (2004)
<i>O. niloticus</i>	Cobre e Cromo	Mortalidade	MASUTTI et al. (2006)
<i>O. niloticus</i>	Cromo	Danos genéticos	MATSUMOTO et al. (2006)

Espécie	Agente tóxico	Efeitos	Referência
<i>G. brasiliensis</i>	Cobre, Cádmio e Zinco	Alteração da atividade de metalotioneínas	RODRÍGUEZ-CEA et al. (2006)
<i>G. brasiliensis</i>	Mistura complexa	Alterações hematológicas e histopatológicas	ROMÃO et al. (2006)
<i>G. brasiliensis</i>	Mistura complexa	Inibição da Acetilcolinestarese, aumento de metalotioneínas e HPAs na bile	LINDE-ARIAS et al. (2008)
<i>G. brasiliensis</i> e <i>O. niloticus</i>	Mistura complexa	Indução do citocromo p450 1A	PARENTE; DE OLIVEIRA; PAUMGARTTEN (2008)
<i>G. brasiliensis</i>	Cobre, Cromo, Zinco e Chumbo	Bioacumulação no músculo e gônadas	TERRA et al. (2008)
<i>G. brasiliensis</i>	2-4D	Alteração no consumo de oxigênio e excreção de amônia	BARBIERI (2009)
<i>G. brasiliensis</i> e <i>O. niloticus</i>	Esgoto doméstico	Danos genéticos	GRISOLIA et al. (2009)
<i>O. niloticus</i>	Cádmio e Zinco	Indução de apoptose e proliferação celular	MONTEIRO et al. (2009)
<i>G. brasiliensis</i>	Cianotoxinas	Alterações enzimáticas e histopatológicas, dano genético e bioacumulação	CLEMENTE et al. (2010)
<i>O. niloticus</i>	POPs	Danos genéticos e bioacumulação	GONZÁLEZ-MILLE et al. (2010)
<i>O. niloticus</i>	Arsênio	Danos genéticos	AHMED et al. (2011)
<i>O. niloticus</i>	Folidol (pesticida organofosforado)	Alterações no consumo de oxigênio e excreção de amônia	BARBIERI; FERREIRA (2011)
<i>G. brasiliensis</i>	Mistura complexa	Danos genéticos, inibição da Acetilcolinesterase e danos histopatológicos	BENINCÁ et al. (2012)
<i>G. brasiliensis</i>	Mistura complexa	Alterações histopatológicas nas brânquias	GOMES et al. (2012)



Espécie	Agente tóxico	Efeitos	Referência
<i>O. niloticus</i>	Cádmio e Cobre	Alterações osmoregulatórias	SAGLAM; ATLI; CANLI (2013)
<i>G. brasiliensis</i>	HPA e metais	Alterações histopatológicas e dano genético	OSÓRIO et al. (2013a)
<i>G. brasiliensis</i>	Metais	Bioacumulação no fígado, brânquias e músculo	VOIGT et al. (2015)
<i>G. brasiliensis</i> e <i>O. niloticus</i>	Mesotriona	Danos genéticos e alterações enzimáticas	PIANCINI et al. (2015)
<i>O. niloticus</i>	Metais	Aumento de metalotioneínas e bioacumulação	CHATTERJEE et al. (2016)
<i>G. brasiliensis</i>	Microcistinas-LR, Metais e HPAs	Alterações enzimáticas, danos genéticos, alterações histopatológicas e bioacumulação	YAMAMOTO et al. (2016)
<i>G. brasiliensis</i>	Cianotoxinas	Danos genéticos, alterações enzimáticas e bioacumulação	CALADO et al. (2017)

## 2.6 BIOMARCADORES

Biomarcadores são alterações no nível sub-individual dos bioindicadores passíveis de serem atribuídas a uma variação ambiental (VAN GESTEL; VAN BRUMMELEN, 1996). Como exemplo, estas alterações podem ser observadas em nível genético, bioquímico e histopatológico, e representam sinais precoces da exposição a contaminantes (VAN DER OOST; BEYER; VERMEULEN, 2003). Desde o início dos anos 80 esforços foram dedicados ao desenvolvimento e aplicação de biomarcadores para uso em ecotoxicologia e avaliação de risco ecológico (FORBES; PALMQVIST; BACH, 2006). Com isso ficou demonstrado que as respostas sub-celulares são mais sensíveis aos agentes tóxicos do que as alterações medidas no nível do organismo e são geralmente mais fáceis de medir em comparação com respostas de longo prazo em níveis mais altos de organização biológica (HAMZA-CHAFFAI, 2014). Vários estudos utilizando a abordagem de multi-biomarcadores relacionaram o aporte celular de agentes tóxicos com alterações negativas na função celular e tecidual, levando a resultados adversos em indivíduos e populações (VILLENEUVE; GARCIA-REYERO, 2011).

A relação entre as respostas de cada um dos biomarcadores ajuda a elucidar informações sobre o potencial tóxico de diversas classes de contaminantes. Por exemplo, sabe-se que existe relação direta entre a indução do estresse oxidativo e os danos no DNA por diversas vias como na indução de lesões em nucleobases e na formação de adutos de DNA (YU et al., 2016). O estresse oxidativo também pode induzir a peroxidação lipídica e o dano em proteínas celulares (JOMOVA; VALKO, 2011).

### 2.6.1 Genotoxicidade

Os primeiros testes para a avaliação de genotoxicidade surgiram quando a ecologia e genética se uniram, para iniciar os estudos na área de toxicologia genética (ANDERSON et al., 1994). Devido às implicações ecológicas diretas associadas com genotoxicidade, a detecção e a quantificação de danos genéticos são de grande interesse em estudos ambientais (NACCI; CAYULA; JACKIM, 1996). A função primária dos testes de toxicologia genética é investigar, usando células ou organismos, o potencial de agentes químicos induzirem mutações nas células somáticas e germinativas (BELFIORE; ANDERSON, 2001).

Sabe-se que até um terço dos agentes tóxicos liberados na natureza apresentam potencial genotóxico para os organismos e por isso vários estudos objetivaram elucidar as consequências destas exposições (LACAZE et al., 2011b; SANTOS et al., 2013b). Quando estes danos ocorrem no DNA de células somáticas, a principal consequência é a alteração do funcionamento celular podendo induzir a morte da mesma (FRENZILLI; NIGRO; LYONS, 2009). Porém, quando esta alteração ocorre no DNA das células germinativas, podem afetar negativamente a progênie. Um estudo recente demonstrou a ligação entre o dano no DNA dos espermatozoides e o prejuízo reprodutivo na espécie de peixe (DEVAUX et al., 2015).

#### *2.6.1.1 Teste do micronúcleo písceo*

O teste do micronúcleo é utilizado como um índice de dano genético acumulado durante o tempo de vida das células, e é considerada uma técnica adequada para avaliar a resposta de várias classes de xenobióticos (BOLOGNESI; HAYASHI, 2011). Este teste foi desenvolvido por Heddle (1973), e consistia em fazer um esfregaço da medula óssea de ratos para avaliar o potencial genotóxico de determinada substância. No entanto, esta técnica sofreu modificações com o passar do tempo, e hoje em dia é muito aplicada para avaliar o efeito de xenobióticos em peixes (AL-SABTI; METCALFE, 1995). Uma das principais adaptações do teste foi a inclusão da análise de anormalidades morfológicas nucleares como o descrito por Carrasco et al. (1990). Este teste pode ser aplicado em vários tipos celulares como eritrócitos, brânquias, rim, fígado e nadadeiras (BOLOGNESI; HAYASHI, 2011). O uso de eritrócitos periféricos é o mais utilizado pois não exige uma preparação complexa do material biológico e permite o monitoramento dos efeitos sem a morte do animal testado (BOLOGNESI et al., 2006). Esse teste também já foi validado tanto para peixes de água doce quanto marinhos, em experimentos de campo ou de laboratório, e para diferentes períodos de exposição (BOLOGNESI; HAYASHI, 2011). Atualmente, sabe-se que existe também uma variabilidade muito grande neste teste para as diferentes espécies de peixes (GRISOLIA et al., 2009).

#### *2.6.1.2 Ensaio Cometa*

O ensaio Cometa é definitivamente a forma mais utilizada na ecotoxicologia para a detecção do potencial genotóxico de xenobióticos em células eucarióticas (NERI et al., 2015). Esta técnica representa uma forma rápida, simples, barata e

eficiente de avaliar danos no DNA de vários tipos de tecidos diferentes em diversos organismos (COLLINS et al., 2008). O ensaio Cometa alcalino apresenta capacidade de detectar quebras de fita simples do DNA, sítios alcali-lábeis, e *cross-linking* (TICE et al., 2000). Neste teste, as células são inseridas em agarose numa lâmina, passam por uma lise celular e por uma eletroforese em tampão alcalino. Com isso, o DNA que estiver fragmentado tende a migrar para o pólo positivo da cuba de eletroforese, enquanto que o DNA intacto permanece agrupado. O padrão utilizado normalmente para estimar o grau de fragmentação do DNA é a porcentagem de DNA na cauda, que pode ser estimada através da utilização de um corante fluorescente e um microscópio para fazer a análise da imagem (AZQUETA et al., 2011).

## 2.6.2 Alterações enzimáticas e estresse oxidativo

Alterações enzimáticas apresentam boa sensibilidade, relativa especificidade e baixo custo de análise, quando comparados às análises químicas (SCHLENK; DAVIS; GRIFFIN, 1999). Estas alterações são as primeiras respostas detectadas frente à variação ambiental. Por isso, biomarcadores bioquímicos são frequentemente mais sensíveis que outros em níveis mais elevados de alterações biológicas, como células, organismos e populações (SCHLENK et al., 2008).

Os biomarcadores que refletem perturbações do metabolismo oxiradical são de primordial importância em aplicações ecotoxicológicas. Isto porque todas as principais classes de poluentes ambientais, através de caminhos diferentes, podem alterar o equilíbrio natural entre as forças pro-oxidantes e as defesas antioxidantes, aumentando a formação de espécies reativas de oxigênio (ROS) e reduzindo a eficiência antioxidante (BENEDETTI; GIULIANI; REGOLI, 2015).

Alguns biomarcadores referem-se ao metabolismo de biotransformação dos agentes tóxicos no organismos. A biotransformação se dá normalmente em duas fases. A fase I consiste em reações de oxidação, redução ou hidrólise, e os produtos formados são frequentemente mais reativos que os iniciais. A fase II consiste na conjugação destas substâncias reativas, provenientes da fase I, a fim de serem eliminadas do organismo como substâncias inertes (ŠIROKÁ; DRASTICHOVÁ, 2004).

### 2.6.2.1 Superóxido dismutase (SOD)

A Superóxido dismutase é uma metaloenzima que atua capturando radicais superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ), sendo considerada primeira linha de defesa antioxidante contra as

espécies reativas de oxigênio geradas pela respiração. A SOD converte o radical  $O_2^{\bullet-}$  em  $H_2O_2$  que posteriormente pode ser convertido em água ( $H_2O$ ) e  $O_2$  pela Catalase (CAT) ou pela glutathiona peroxidase (GPx) (SHENG et al., 2014). O radical  $O_2^{\bullet-}$  está relacionado a diversos efeitos deletérios nas células como a peroxidação lipídica, danos no DNA e a oxidação de proteínas sulfidrilas (CROUCH et al., 1981). A SOD pode se apresentar em duas formas em células eucarióticas, complexadas ao manganês (SOD/Mn) nas mitocôndrias e complexadas ao cobre-zinco (SOD/Cu-Zn) no citoplasma (SHENG et al., 2014).

#### 2.6.2.2 Catalase (CAT)

A Catalase é uma enzima que apresenta duas funções dentro das células dos organismos. A primeira é a decomposição do  $H_2O_2$  em  $H_2O$  e  $O_2$  e a segunda é a oxidação de doadores de  $H^+$  como o metanol, etanol, ácido fórmico e fenóis (AEBI, 1984). A Catalase é encontrada nos peroxissomos e é a enzima mais abundante desta organela (GOLDMAN; BLOBEL, 1978). Esta enzima faz parte do metabolismo de defesa antioxidante das células, contribuindo para evitar a formação de radicais  $OH^{\bullet}$ , que também estão relacionados ao estresse oxidativo (NICHOLLS, 2012). A atividade dela pode ser alterada pela exposição a diversas classes de xenobióticos (NICHOLLS, 2012).

#### 2.6.2.3 Glutathiona peroxidase (GPx)

A glutathiona peroxidase é uma enzima antioxidante que catalisa a redução do  $H_2O_2$  em  $H_2O$  utilizando a glutathiona (GSH) como um co-substrato obrigatório (LUBOS; LOSCALZO; HANDY, 2011). O mecanismo catalítico da GPx envolve a redução de uma molécula de  $H_2O_2$  através da oxidação de duas moléculas de GSH, gerando no final uma molécula de GSSG e duas moléculas de  $H_2O$  (BHOWMICK et al., 2015).

#### 2.6.2.4 Glutathiona reduzida (GSH)

A glutathiona é um importante antioxidante presente em praticamente todos organismos vivos. A glutathiona previne o dano oxidativo em macromoléculas celulares causado por espécies reativas de oxigênio (POMPELLA et al., 2003). A GSH atua como substrato para diversas reações de conjugação catalisadas pela GST no citosol, microssomos e mitocôndrias (POMPELLA et al., 2003). A GSH também atua no

processo de conjugação não-enzimática de alguns xenobióticos (LAWRENCE; HEMINGWAY, 2003).

#### 2.6.2.5 Carbonilação proteica (PCO)

A carbonilação proteica é resultado da ação direta de espécies reativas de oxigênio produzindo modificações oxidativas nas proteínas (BERLETT; STADTMAN, 1997). A introdução de grupos carbonil nos resíduos de aminoácidos é uma marca registrada destas modificações oxidativas. Por isso, a reação destes grupos carbonil com reagentes específicos é uma forma eficiente de inferir se está ocorrendo dano oxidativo em proteínas (LEVINE et al., 1990). Uma vez sujeitas ao dano oxidativo, as proteínas precisam ser reparadas, no entanto se isso não for possível, elas são degradadas e eliminadas das células para minimizar efeitos negativos potenciais destas moléculas. Sabe-se que quase todos os aminoácidos são susceptíveis a modificação oxidativa causada pelas espécies reativas de oxigênio (ALMEIDA; DE OLIVEIRA RIBEIRO, 2014).

#### 2.6.2.6 Lipoperoxidação (LPO)

A lipoperoxidação é um processo fisiológico relacionado a maturação celular e mobilização de lipídios (SCHEWE; RAPOPORT; KUHN, 1986). Alguns xenobióticos podem afetar esse processo, gerando perda na integridade da membrana com aumento de sua permeabilidade, alteração no fluxo de íons transmembrana, disfunção no transporte de  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ , influxo excessivo de cálcio e ativação de enzimas como as proteases, fosfolipases e nucleases (AMADOR; OLIVEIRA, 1999; BARREIRO et al., 2006; MEAGHER; FITZGERALD, 2000). A LPO tem sido utilizada com sucesso como medida de estresse oxidativo induzido por xenobióticos como, por exemplo, os metais (VALAVANIDIS et al., 2006).

#### 2.6.2.7 Etoxiresorufina-O-deetilase (EROD)

A etoxiresorufina-O-deetilase é uma das enzimas responsáveis pelas reações catalisadas pela subfamília CYP1A1 (WEBB; GAGNON; ROSE, 2008). Ela catalisa uma reação de O-desalquilação, dependente de NADPH, na qual o substrato é a 7-etoxiresorufina, o produto formado na reação, a resorufina, pode ser medida por espectrofluorímetro (FENT; STEGEMAN, 1993). A reação promovida pela EROD é altamente induzida ou inibida pela exposição a alguns agentes tóxicos, como

hidrocarbonetos policíclicos aromáticos e metais (VAN DER OOST; BEYER; VERMEULEN, 2003).

#### 2.6.2.8 *Glutathione S-transferase (GST)*

A Glutathione S-transferase é um enzima que catalisa a conjugação das glutathionas a diversos substratos hidrofóbicos eletrofílicos a fim de torná-los menos reativos para serem eliminados pelas células (SRIKANTH et al., 2013). Esta enzima faz parte do chamado metabolismo de biotransformação de fase II, que tem como função conjugar os xenobióticos a moléculas polares e torná-los menos ativos que os seus substratos originais (LANDI, 2000). É importante ressaltar também o papel antioxidante da GST, reduzindo a peroxidação lipídica e detoxificando os produtos finais deste processo (SINGHAL et al., 2015). A GST faz parte de uma superfamília de enzimas diméricas que ocorrem em organismos procarióticos, plantas, moluscos, crustáceos, insetos, anfíbios, répteis, peixes e mamíferos. Em vertebrados, elas estão mais presentes no fígado (VAN DER OOST; BEYER; VERMEULEN, 2003).

#### 2.6.2.9 *Metalotioneínas (MT)*

Dentre os principais mecanismos celulares induzidos pela exposição ao cobre encontramos as metalotioneínas. Estas proteínas apresentam baixo peso molecular, variando de 6 a 7 kDa, e são ricas em cisteínas, o que confere a elas a capacidade de se ligar a íons metálicos (SHARIATI; SHARIATI, 2011). Devido a este potencial, as metalotioneínas agem de forma muito potente na detoxificação do cobre das células dos organismos, além de apresentarem alta estabilidade térmica (D'AURIA et al., 2001). A principal função das metalotioneínas é manter estáveis os níveis dos metais essenciais como o Cu e Zn no meio intracelular (VIARENGO et al., 1997). Além disso, estas proteínas podem atuar na proteção da célula contra metais que estejam em concentrações tóxicas (DE BOECK et al., 2003; HAUSER-DAVIS et al., 2014; MCCARTER; ROCH, 1984). A indução da metalotioneína em peixes expostos a metais já foi reportada, embora os mecanismos relacionados a regulação destes metais nos organismos ainda não estão completamente compreendidos (CHATTERJEE et al., 2016). É esperado que o fígado seja o órgão que apresente os maiores níveis de metalotioneínas, no entanto estes valores podem variar muito nos organismos (FILIPOVIĆ; RASPOR, 2003). Trabalhos anteriores relataram a indução destas proteínas em outros tecidos como o rim, brânquias, cérebro, músculo e

vesícula biliar de peixes (DE BOECK et al., 2003; FILIPOVIĆ; RASPOR, 2003; HAUSER-DAVIS et al., 2014). Por ser considerado um biomarcador específico para a exposição aos metais, a metalotioneína tem sido utilizada frequentemente em estudos relacionados a este tema. Além disso, estas proteínas também podem ser marcadores de estresse oxidativo (não só por metais) devido a nucleofilicidade dos seus grupos sulfidrilas (VIARENGO et al., 2000).

### 2.6.3 Histopatologia

A histopatologia é uma ferramenta útil que pode demonstrar efeitos decorrentes da exposição de xenobióticos, representando um nível intermediário de organização biológica (MYERS et al., 1998). A utilização da histopatologia em avaliações ambientais permite detectar os efeitos agudos e crônicos da exposição dos indivíduos à xenobióticos, pois permite avaliar seus efeitos diretamente em nível celular e tecidual, em contraste aos biomarcadores bioquímicos, que detectam os efeitos do agente tóxico em nível subcelular (ALMEIDA; DE OLIVEIRA RIBEIRO, 2014). Os biomarcadores histopatológicos juntamente com os bioquímicos permitem analisar as respostas fisiológicas dos indivíduos, assim como estabelecer o grau de toxicidade dos contaminantes (AKAISHI et al., 2004). Este biomarcador tem a capacidade de diferenciar lesões nos órgãos induzidas por doenças e outros fatores do meio ambiente daquelas provocadas pela exposição aos poluentes (SCHWAIGER et al., 1997). Assim, as lesões encontradas podem ser utilizadas para monitorar os efeitos dos poluentes (ALMEIDA; DE OLIVEIRA RIBEIRO, 2014).



### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar os efeitos do cobre sobre a perspectiva de exposição, depuração e reprodução em duas espécies de ciclídeos (*Geophagus brasiliensis* e *Oreochromis niloticus*) utilizando multi-biomarcadores.

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Avaliar os efeitos da exposição e depuração do cobre em duas espécies de ciclídeos através da abordagem de multi-biomarcadores.

Avaliar o metabolismo dependente de metalotioneínas e os danos em macromoléculas induzidos pelo cobre em duas espécies de ciclídeos após exposição e depuração.

Avaliar os efeitos do cobre no DNA parental e relacioná-los ao prejuízo reprodutivo em *Oreochromis niloticus*.

### **ABORDAGEM DE MULTI-BIOMARCADORES PARA AVALIAR OS EFEITOS DA EXPOSIÇÃO E DEPURAÇÃO DO COBRE EM DUAS ESPÉCIES DE CICLÍDEOS**

Gustavo Souza Santos<sup>1</sup>, Flávio Henrique Tincani<sup>1</sup>, Mario Junior Nadaline Barbosa<sup>1</sup>,  
Sabrina Loise de Moraes Calado<sup>2</sup>, Ana Carolina Barni de Azevedo<sup>3</sup>, Cinthia Eloise  
Domingues<sup>4</sup>, Ciro Alberto de Oliveira Ribeiro<sup>3</sup>, Sandro Xavier Campos<sup>4</sup>, Helena  
Cristina Silva de Assis<sup>2</sup>, Marta Margarete Cestari<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Departamento de Genética, Centro Politécnico, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Brasil

<sup>2</sup> Departamento de Farmacologia, Centro Politécnico, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Brasil

<sup>3</sup> Departamento de Biologia Celular, Centro Politécnico, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Brasil

<sup>4</sup> Grupo de Pesquisa em Química Analítica Ambiental e Sanitária, Universidade Estadual de Ponta Grossa, Ponta Grossa, Brasil

#### 4.1 RESUMO

Este trabalho avaliou as respostas de multi-biomarcadores em duas espécies de peixes expostos ao cobre e sujeitos a depuração. Juntamente com a degradação do ambiente, populações de *O. niloticus* têm sido associadas ao declínio de populações de *G. brasiliensis*, visto que estas espécies apresentam sobreposição de nichos e diferentes respostas aos contaminantes ambientais. Os peixes de cada espécie foram expostos a uma concentração de 65µg/L de sulfato de cobre por 7 dias. Após a exposição, os peixes mantidos em um sistema de depuração pelos períodos de 7, 14, 28, 42, 56 e 84 dias. Em cada período foram avaliados genotoxicidade, estresse oxidativo, processos metabólicos relacionados a biotransformação (atividade de enzimas de fase I e II) e a histopatologia do fígado. A concentração de cobre foi quantificada no fígado e no músculo. Para *G. brasiliensis*, CAT, SOD e GSH não apresentaram diferença entre os grupos, a atividade da GST e da GPx aumentaram após 42 dias de depuração. Houve um aumento dos danos no DNA após 42 dias de depuração, os quais foram reparados em 56 dias. A concentração de cobre no fígado aumentaram após a exposição ao cobre e mantiveram valores similares até o fim do experimento. Para *O. niloticus*, a atividade da CAT, SOD, GPx e GST diminuíram após 7 dias de depuração. CAT e SOD mantiveram valores baixos até o fim do experimento em 84 dias. A atividade da GST apresentou um aumento em 42 dias, mas foi novamente reduzida após 84 dias. Foram observados danos no DNA do sangue e fígado após 42 dias, sendo reparados após 84 dias. Também para esta espécie foi observado um aumento da ocorrência de alterações histopatológicas as quais diminuíram em 28 dias. Os níveis de cobre aumentaram após a exposição e foram aumentando a medida que o tempo passou, atingindo os maiores valores em 84 dias de depuração. Os tempos de depuração de 56 dias para o *G. brasiliensis* e 84 dias para *O. niloticus* não foram suficientes para que estes organismos apresentem recuperação do estado de homeostase. Resultados obtidos neste trabalho mostraram o cobre afeta diferentemente as espécies de peixe.

#### 4.2 INTRODUÇÃO

Os efeitos da contaminação por metais em organismos aquáticos têm sido o foco de diversos estudos ao redor do mundo. Dentre estes metais, o cobre é um dos mais estudados. Este elemento é um dos metais mais abundantes na natureza e essencial para o funcionamento de diversos complexos enzimáticos nos organismos.

No entanto, quando em elevadas concentrações pode apresentar atividade tóxica e bioacumular nos tecidos destes organismos (OECD, 2014).

A toxicidade do cobre em peixes já foi demonstrada em diversos estudos (GROSELL; WOOD; WALSH, 2003; KRUMSCHNABEL et al., 2005; MONTEIRO et al., 2009), com a sua toxicocinética e toxicodinâmica esclarecida para determinadas espécies. Diversos autores atribuem a toxicidade do cobre ao mecanismo de produção de espécies reativas de oxigênio e consequentemente ao estresse oxidativo. Os efeitos causados por esse estresse podem atingir macromoléculas como o DNA e proteínas, além de alterarem o funcionamento de diversas enzimas, e induzir a morte celular (KRUMSCHNABEL et al., 2005).

O uso de biomarcadores em bioensaios em laboratórios é reconhecidamente uma forma eficiente de avaliar dos efeitos de metais (SÁNCHEZ-CHARDI et al., 2008). No entanto, a maioria dos estudos refere-se somente aos efeitos da exposição, sendo a depuração um tema ainda pouco explorado dentro da ecotoxicologia. Sabe-se que determinadas respostas biológicas relacionadas aos exposição, acumulação e depuração dos metais podem ser superestimadas devido a variabilidade de mecanismos celulares utilizados pelos peixes (MARTÍN-DÍAZ et al., 2004; POURKHABBAZ; ALIPOUR; ZAREI, 2015). Adicionalmente, os metais apresentam altas taxas de acumulação e baixas de depuração em peixe (KALAY; CANLI, 2000). Por isso, a relação entre a concentração de metais na água e nos peixes, assim como os efeitos biológicos desta exposição necessitam ser estudados (ZENG et al., 2013). Durante depuração, alguns metais essenciais como o Cu podem apresentar taxas variáveis de eliminação e acumulação (DANG; ZHONG; WANG, 2009). Há uma tendência progressiva ao longo do tempo para níveis de metais estabilizarem ou diminuírem na maioria dos órgãos, no entanto, estes valores tendem a aumentar em tecidos alvo como o fígado (GROSELL, 2011).

A espécie *Geophagus brasiliensis*, também conhecida como acará, possui ampla distribuição em ambientes lênticos do Brasil, mas é considerada invasora em alguns países devido ao interesse no uso desta espécie no aquarismo (BEATTY et al., 2013).. A espécie *Oreochromis niloticus*, também conhecida como tilápia-do-Nilo, é originária da bacia do rio Nilo, entretanto apresenta distribuição global pois foi introduzida em diversos países visando a produção de alimento (WATANABE et al., 2002). Esta espécie é frequentemente encontrada em ambientes lênticos do Brasil, e

juntamente com a degradação dos ambientes, tem sido associada ao declínio de populações de *G. brasiliensis* (LINDE et al., 2008). Estas espécies apresentam muitas semelhanças comportamentais e fisiológicas, além de apresentarem sobreposição de nichos (LINDE et al., 2008). Ambas espécies tem sido alvos de estudos relacionando biomarcadores a exposição a contaminantes (BARBIERI, 2009; BENINCÁ et al., 2012; OSÓRIO et al., 2013; PIANCINI et al., 2015). Neste contexto, alguns estudos recentes abordam a temática da diferença na sensibilidade a diversas classes de agentes tóxicos entre espécies nativas e exóticas (MACEDA-VEIGA; DE SOSTOA, 2011). Isto permite aos pesquisadores prever as consequências da relação entre o aporte de contaminantes e a manutenção da biodiversidade local em ambientes aquáticos.

O presente estudo investigou as respostas de multi-biomarcadores em duas espécies de ciclídeos expostas ao cobre e sujeitas a vários períodos de depuração. Para isso, foram avaliados genotoxicidade, estresse oxidativo, processos metabólicos relacionados a biotransformação (atividade de enzimas de fase I e II) e a histopatologia do fígado. Adicionalmente, foram obtidos os índices biométricos dos peixes e análises químicas do cobre em órgãos alvo e na água. Finalmente, com estas informações, foram discutidos os efeitos do cobre sobre cada uma destas espécies e os mecanismos relacionados aos processos de detoxificação do metal nestes organismos.

#### 4.3 MATERIAL E MÉTODOS

##### 4.3.1 Desenho experimental

Adultos de acará (*G. brasiliensis*) medindo  $11,02 \pm 1,36$  cm (média  $\pm$  DP) e pesando  $17,69 \pm 6,74$  g (média  $\pm$  DP) e de tilápia (*O. niloticus*) medindo  $11,98 \pm 0,85$  cm (média  $\pm$  DP) e pesando  $26,4 \pm 4,61$  g (média  $\pm$  DP) foram coletados em uma piscicultura próxima a Curitiba. Os peixes foram aclimatados em água filtrada por 30 dias antes do início dos experimentos. Após esse período, 84 peixes de cada espécie foram expostos a concentração nominal de sulfato de cobre de  $65 \mu\text{g/L}$  (BENINCÁ et al., 2012) de forma hídrica semi-estática por 7 dias com renovação de 2/3 da água com o contaminante a cada 48 horas. Além destes, 12 peixes de cada espécie foram mantidos separadamente como controle negativo.

Os experimentos foram conduzidos em aquários plásticos de 50 L com aeração constante, fotoperíodo 12h:12h, temperatura de  $21,4 \pm 0,8^\circ\text{C}$ , pH  $7,1 \pm 1$  e oxigênio

dissolvido  $15,3 \pm 1,06$  mg/L. Neste experimento foi mantida a proporção de 3g de peixe por litro de água em cada aquário. Após 7 dias de exposição, 24 peixes (12 controle negativo e 12 expostos) de cada espécie foram anestesiados com o auxílio de benzocaína (75 mg/L). O restante dos peixes foi conduzido para um sistema de fluxo contínuo de água filtrada pelos períodos de depuração de 7, 14, 28, 42, 56 e 84 dias, e 12 peixes de cada espécie foram eutanasiados em cada período. Foram retirados dos peixes anestesiados, o sangue por meio de punção cardíaca com auxílio de um tubo hematócrito heparinizado, o fígado e uma porção do músculo. O sangue foi utilizado para as análises do ensaio Cometa e teste do Micronúcleo pisco. O fígado foi utilizado para as análises do ensaio cometa, atividade das enzimas Superóxido dismutase (SOD), Catalase (CAT), Glutathione peroxidase (GPx), quantificação de glutathione reduzidas (GSH), Etoxiresorufina-O-deetilase (EROD), Glutathione S-transferase (GST), além das análises histopatológicas. A concentração de cobre foi aferida no fígado e no músculo dos peixes.

Todos os indivíduos do experimento foram pesados e medidos (comprimento total) para determinar o Fator de Condição (K), sendo estimado pela fórmula  $K = PT/CT.b$ , onde PT representa o peso total em gramas, CT o comprimento total do exemplar em centímetros e b é o coeficiente angular da relação peso-comprimento, obtido a partir da regressão linear entre PT e CT. Os fígados dos exemplares foram pesados, fornecendo os dados para o cálculo do Índice Hepatosomático (IHS). O IHS foi estimado pela fórmula  $IHS = PF/PT \times 100$ , onde PF representa o peso do fígado em gramas.

#### 4.3.2 Quantificação de cobre

A concentração de cobre foi quantificada na água, no fígado e músculo dos peixes utilizados no experimento. A concentração de cobre na água foi aferida em amostras de 12 mL de água a cada renovação, as quais foram adicionadas a 2 mL de  $HNO_3$  logo após a coleta. As amostras foram mantidas a 4 °C até o período da análise. Foram coletados fígado e músculo dos peixes e estocados à -80°C para posterior análise da bioacumulação do cobre. Após a digestão ácida (Método US EPA 3005A para água, Método US EPA 3050B para as análises nos tecidos), foi utilizado um espectrômetro de absorção atômica em chama para detectar o cobre (FAAS, Varian, AA 240FS). O conteúdo de Cu inorgânico do  $CuSO_4$  utilizado no experimento foi de 25,4%.

### 4.3.3 Biomarcadores

O sangue e uma porção do fígado foram armazenados no gelo, no escuro em soro bovino fetal por 2 horas antes da realização do ensaio cometa. Outra porção do fígado foi armazenado em -80 °C para a realização das análises dos biomarcadores bioquímicos.

#### 4.3.3.1 *Teste do micronúcleo písceo*

Para a análise de micronúcleos (MN) foi empregada a técnica descrita por Heddle (1973), com modificações de Ferraro et al. (2004). Imediatamente após a coleta do sangue, foi realizado um esfregaço em uma lâmina e fixado com etanol absoluto por 30 min. As lâminas foram coradas com Giemsa a 5%, diluída em tampão fosfato com pH 6,8, por 10 min. A análise foi feita em microscópio óptico com aumento de 400 vezes. Foram computados micronúcleos e alterações morfológicas nucleares dos tipos blebbed (B), lobed (L), notched (N) e vacuolated (V) segundo Carrasco; Tilbury; Myers (1990).

#### 4.3.3.2 *Ensaio cometa*

O ensaio cometa para eritrócitos, foi realizado segundo Singh et al. (1988) modificado por Cestari et al. (2004) e Ferraro et al. (2004), e o ensaio cometa para células do fígado foi realizado segundo Singh et al. (1988) modificado por Ramsdorf et al. (2009b). Primeiramente, 50 µL do sangue dos peixes foi preservado em 200 µL soro bovino fetal (Gibco) por 2 horas segundo Ramsdorf et al. (2009a). Então, 10 µL desta solução foi diluído em 120 µL de agarose de baixo ponto de fusão (Sigma) e foi espalhado em uma lâmina previamente coberta com uma camada de agarose ultrapura (Sigma). As lâminas foram colocadas em uma solução de lise (2,5 M NaCl, 100 mM EDTA, 10 mM Tris, 0,8% NaOH, 1% N-lauryl-sarcosinate, 1% Triton X-100 and 10% DMSO) a 4 °C. Após 72 horas, as lâminas foram imersas em uma solução com pH>13 (10 M NaOH, 200 mM EDTA) por 25 minutos para desnaturação do DNA. Foi realizada a eletroforese a 300 mA e 1 V/cm por 25 minutos. As lâminas foram neutralizadas com 0,4 M Tris-HCl, fixadas em etanol absoluto por 10 minutos e coradas com brometo de etídeo 0,5 g/mL. Para análise dos cometas, foi utilizado o programa Metafer CometScan modelo v.2.8.0® ajustado para a plataforma Metafer de escaneamento automatizado de lâminas produzido pela Metasystems (Altlussheim,

Alemanha). Os 100 cometas contabilizados por lâmina foram avaliados em relação a percentagem de DNA na cauda.

#### *4.3.3.3 Extração enzimática*

As amostras de fígado foram descongeladas e homogeneizadas em tampão fosfato de potássio 0,1M pH 7,0. Em seguida centrifugadas a 10.000 xg por 20 min a 4°C. O sobrenadante do fígado foi utilizado para medir a atividade das enzimas Catalase (CAT), Glutathione S-transferase (GST), Glutathione peroxidase (GPx), Superóxido dismutase (SOD), Etoxiresorufina-O-deetilase (EROD), e para quantificação de glutathione reduzida (GSH). A concentração proteica foi determinada utilizando o método de Bradford (1976) com albumina de soro bovino (BSA) como padrão.

#### *4.3.3.4 Superóxido dismutase*

A atividade da Superóxido dismutase (SOD) foi determinada pela capacidade desta enzima em inibir a auto-oxidação do pirogalol. O sobrenadante foi diluído de 1:10 em tampão fosfato de potássio 0,1M, pH 7,0. Foram adicionados 885 µL de tampão (Tris-base 1M / EDTA 5 mM pH 8,0) a 40 µL de amostra. 50 µL de pirogalol 15 mM foram adicionados e a solução foi incubada por 30 minutos. A reação foi interrompida com 25 µL de HCl 1N. Em microplaca foram adicionados 300 µL da solução e a leitura foi realizada em espectrofotômetro a 440 nm. A quantidade de SOD que inibiu a reação em 50% equivale a 1 unidade (U) de SOD. Os resultados foram expressos em U de SOD/mg de proteína (GAO et al., 1998).

#### *4.3.3.5 Catalase*

A atividade da Catalase (CAT) foi determinada através da medição do consumo de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> no comprimento de onda de 240 nm utilizando 20 mM de substrato de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em 80 mM de tampão Tris/EDTA (pH 8,0) segundo Aebi (1984). A atividade enzimática foi expressa em mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> consumido/min/mg de proteína.

#### *4.3.3.6 Glutathione peroxidase*

A atividade da Glutathione peroxidase (GPx) foi determinada pelo consumo de NADPH durante a formação de glutathione reduzida pela glutathione redutase. Foi utilizado o meio de reação contendo 0,2 mM do substrato H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em 100 mM de tampão fosfato-potássio (pH 7), contendo ainda glutathione (2 mM), azida de sódio (0,5



mM), glutathione redutase (2 U/mL) e NADPH (120  $\mu$ M). A atividade enzimática foi medida em 340 nm e foi expressa em nmol/min/mg proteína (PAGLIA; VALENTINE, 1967).

#### 4.3.3.7 *Glutathione reduzida*

A quantificação de glutathiones reduzidas (GSH) foi medida adicionando 50  $\mu$ L de ácido tricloroacético (TCA) em 200  $\mu$ L do sobrenadante para precipitação proteica. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 10.000 x g por 10 min a 4°C. Para as leituras, foram adicionados 50  $\mu$ L do sobrenadante da amostra e 230  $\mu$ L de tampão Tris-base (400 mM, pH 8,9) a uma microplaca. Como branco, foi utilizado 230  $\mu$ L do tampão Tris-base a 400 mM mais 50  $\mu$ L de TCA a 10% em PBS. Por último, 20  $\mu$ L de DTNB (ácido 5,5' -ditio-bis-2-nitrobenzóico) a 2,5 mM (em metanol a 25%, tampão Tris-base 300 mM, pH 8,9) foram acrescentados e as medidas de absorbância lidas a 415 nm em espectrofotômetro. A determinação do conteúdo de GSH foi realizada através de comparação com curva-padrão de GSH (0, 1, 2, 4, 8, 16, 24 e 32  $\mu$ M GSH) e expressos em  $\mu$ mol de GSH por mg de proteína (SEDLAK; LINDSAY, 1968).

#### 4.3.3.8 *Etoxi-resorufina-O-deetilase*

A atividade da etoxi-resorufina-O-deetilase (EROD) foi medida utilizando 50  $\mu$ L do sobrenadante e 200  $\mu$ L da solução de reação (0,1 M Tris / pH 7,5, 0,1 M NaCl, 3  $\mu$ M 7-etoxi-resorufina) em uma microplaca. A atividade enzimática foi medida em 530 nm (excitação) e 590 nm (emissão) por 10 minutos. Os valores foram expressos em pmol/min/mg proteína (BURKE; MAYER, 1974).

#### 4.3.3.9 *Glutathione S-transferase*

A atividade da Glutathione S-transferase (GST) foi determinada utilizando 20  $\mu$ L do sobrenadante e 180  $\mu$ L de meio de reação (3 mM GSH, 3 mM CDNB, 0,1 M tampão fosfato-potássio, pH 6,5) numa microplaca. O aumento na absorbância foi medido a 340 nm em intervalos de 15 s. A atividade enzimática foi expressa em nmol/min/mg proteína (KEEN; HABIG; JAKOBY, 1976).

#### 4.3.3.10 *Histopatologia de fígado*

Uma porção do fígado foi quimicamente preservada em ALFAC (85% etanol, 10% formalina e 5% ácido acético) por 16h e mantido em etanol 70% a 4 °C. As amostras foram desidratadas em uma série gradual de concentrações de álcool (80%,

90%, 95% e 100%) e foram inseridas em Paraplast Plus (Sigma). Secções de 5 µm de espessura foram obtidas num micrótomo Leica e coradas com hematoxilina e eosina. Imagens foram feitas utilizando uma câmara digital acoplada a um fotomicroscópio de luz Leica. Histopatologia foi analisada segundo Bernet et al. (1999) e Almeida; Oliveira Ribeiro (2014). As principais alterações avaliadas no fígado foram: Necroses, Infiltrações Leucocitárias, Vacuolizações, Congestões e Granulomatoses.

#### 4.3.4 Análise estatística

Previamente a análise, os dados foram testados em relação a normalidade (Teste de Kolmogorov-Smirnov) e homocedasticidade (Teste de Bartlett). Então foi aplicado uma ANOVA com pós teste de Dunnett a fim de observar as diferenças significativas do grupo exposto em relação aos tempos de depuração, para todas as variáveis analisadas. Quando os dados não atingiram os pressupostos foi utilizado o teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis com pós teste de Dunn. O nível de significância considerado foi de  $p < 0,05$ . Os *outliers* foram removidos pelo teste de ROUT com linha de corte em 5%.

Para a abordagem multivariada, os dados foram padronizados para que todos os dados biológicos de naturezas diferentes sejam considerados com a mesma importância. Foi conduzida uma análise de componentes principais (PCA) com os biomarcadores avaliados no fígado para verificar a interdependência entre os grupos e as respostas dos biomarcadores. Para isso, somente os indivíduos que possuíam todos os dados biológicos pareados foram considerados. O número de componentes interpretáveis foi feito segundo o critério de Kaiser-Guttman (BORCARD; GILLET; LEGENDRE, 2011). A correlação entre os eixos interpretáveis da PCA e as respostas dos biomarcadores foi analisada através do índice de Pearson.

### 4.4 RESULTADOS

Os peixes da espécie *G. brasiliensis* morreram nos tanques antes dos 84 dias, portanto não obtivemos resultados para esta espécie neste período.

#### 4.4.1 Índices biométricos

Os índices biométricos (Fator de condição e Índice hepatossomático) estão ilustrados na Figura 3. Para *G. brasiliensis*, não foram observadas diferenças entre os grupos para o fator de condição ( $p > 0,05$ ), entretanto foi possível observar uma

diminuição do índice hepatossomático após a exposição ao cobre, com estes valores sendo retomados após 7 dias de depuração ( $p < 0,05$ ; Fig. 3 A-B). Para *O. niloticus*, não foram observadas diferenças entre os grupos para o fator de condição ( $p > 0,05$ ), porém, foi possível observar uma diminuição do índice hepatossomático após 56 dias de depuração ( $p < 0,05$ ; Fig. 3 C-D).

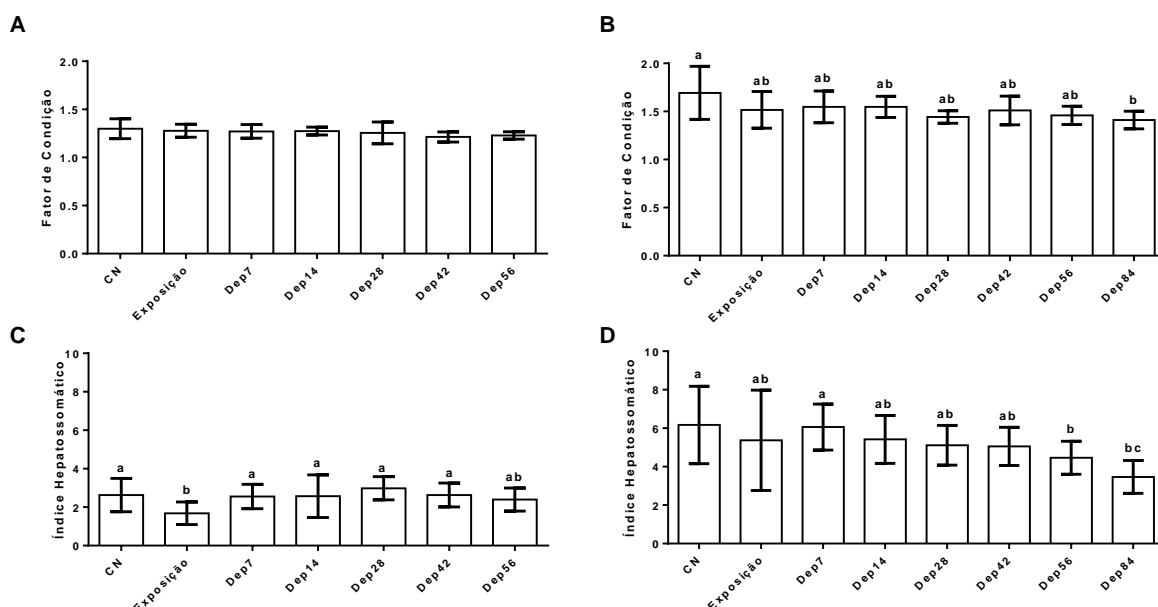


Figura 3 - Índices biométricos (Fator de Condição e Índice Hepatossomático) avaliados em *G. brasiliensis* (A-C) e *O. niloticus* (B-D) expostos ao cobre e sujeitos a depuração. N= 68. ANOVA (média  $\pm$  DP). Letras indicam diferenças significativas entre os grupos (a, b).

#### 4.4.2 Quantificação de cobre

Para *G. brasiliensis*, os níveis de cobre no fígado aumentaram após a exposição e se mantiveram em níveis similares, ainda que baixos, durante todo o período de depuração. No entanto, estes valores diminuíram no músculo após 42 dias de depuração. Na água, foram detectados valores máximos de cobre de 14,6  $\mu\text{g/L}$  e mínimos de 0,8  $\mu\text{g/L}$  durante a exposição, se mantendo numa média de 4,1  $\mu\text{g/L}$  (Tabela 2).

Para *O. niloticus*, os níveis de cobre no fígado aumentaram após a exposição e aumentaram continuamente durante a depuração, atingindo 33  $\mu\text{g/g}$  em 84 dias. Já no músculo, os níveis de cobre aumentaram após a exposição e se mantiveram em níveis similares durante todo o período de depuração. Na água, foram detectados valores máximos de cobre de 13,5  $\mu\text{g/L}$  e mínimos de 0,6  $\mu\text{g/L}$  durante a exposição,

se mantendo numa média de 5,3 µg/L. Não foram detectados níveis de cobre na água utilizada para o controle negativo e depuração em nenhuma das medições realizadas (Tabela 2).

Tabela 2 – Concentração de cobre no fígado e músculo de *G. brasiliensis* e *O. niloticus* e na água utilizada no experimento.

	<i>G. brasiliensis</i>			<i>O. niloticus</i>		
	Fígado (µg/g)	Músculo (µg/g)	Água (µg/L)	Fígado (µg/g)	Músculo (µg/g)	Água (µg/L)
CN	1,34 ± 0,16	0,1 ± 0,05	<LD	6,6 ± 0,12	<LD	<LD
Exposição	2,83 ± 0,67	0,11 ± 0,05	4.1±3,25	8,4 ± 2,6	0,12 ± 0,02	5,3 ± 2,62
Dep7	1,18 ± 0,07	0,12 ± 0,09	<LD	13,99 ± 1,68	0,61 ± 0,07	<LD
Dep14	0,44 ± 0,09	0,21 ± 0,08	<LD	12,65 ± 1,69	0,65 ± 0,08	<LD
Dep28	1,52 ± 0,09	0,13 ± 0,03	<LD	15,05 ± 5,13	0,69 ± 0,13	<LD
Dep42	2,03 ± 0	0,001 ± 0	<LD	16,8 ± 0,06	0,72 ± 0	<LD
Dep56	1,02 ± 0,25	0,016 ± 0	<LD	19,89 ± 4,85	0,53 ± 0,08	<LD
Dep84	nd	nd	<LD	33,36 ± 5,27	0,56 ± 0	<LD

Dados expressos em Médias ± DP

<LD = abaixo dos limites de detecção

nd = não determinado

#### 4.4.3 Biomarcadores

Os resultados do teste do micronúcleo písceo e alterações morfológicas nucleares em *G. brasiliensis*, demonstraram diminuição da frequência da alteração morfológica nuclear do tipo Lobed após 7 e 28 dias e Alterações totais após 7 dias ( $p < 0,05$ ). Não foram observadas diferenças entre os grupos para a frequência de micronúcleos e alterações do tipo *Blebbled*, *Notched* e *Vacuolated*. Para *O. niloticus*, não foram observadas diferenças entre os grupos para nenhuma das alterações avaliadas pelo teste do micronúcleo písceo ( $p > 0,05$ ) (Tabela 3).

Tabela 3 – Micronúcleos e alterações morfológicas nucleares / 1000 observadas em *G. brasiliensis* e *O. niloticus* expostos ao sulfato de cobre e sujeitos a depuração.

	MN	Blebbled	Lobed	Vacuolated	Notched	Alterações Totais
<i>G. brasiliensis</i>						
CN	0,0 ± 0,0	0,9 ± 0,9	0,7 ± 1,0 a	1,8 ± 1,5	3,9 ± 2,8	7,3 ± 5,0 a
Exposição	0,0 ± 0,0	0,8 ± 0,7	1,0 ± 1,7 a	1,3 ± 2,0	3,3 ± 3,7	6,5 ± 5,5 a
Dep7	0,0 ± 0,0	0,5 ± 0,9	0,0 ± 0,0 b	0,5 ± 0,8	1,0 ± 0,6	2,0 ± 1,5 b
Dep14	0,0 ± 0,0	0,5 ± 1,0	0,4 ± 0,6 ab	0,6 ± 0,8	3,5 ± 3,8	5,0 ± 5,3 a
Dep28	0,0 ± 0,0	0,3 ± 0,6	0,1 ± 0,2 b	0,5 ± 0,4	3,3 ± 5,0	4,4 ± 5,8 ab
Dep42	0,0 ± 0,0	0,3 ± 0,3	0,2 ± 0,3 ab	0,7 ± 1,2	4,6 ± 3,1	5,7 ± 4,5 ab
Dep56	0,1 ± 0,2	1,2 ± 1,1	0,7 ± 0,8 ab	1,3 ± 1,7	3,2 ± 1,7	6,4 ± 4,3 a
<i>O. niloticus</i>						
CN	0,0 ± 0,1	1,5 ± 1,6	0,3 ± 0,5	0,4 ± 0,6	4,6 ± 3,5	5,7 ± 2,6
Exposição	0,5 ± 0,9	2,4 ± 2,1	0,8 ± 1,2	0,5 ± 0,6	5,5 ± 4,3	9,3 ± 6,2
Dep7	0,2 ± 0,3	1,8 ± 1,0	0,1 ± 0,2	0,2 ± 0,3	5,0 ± 4,0	7,6 ± 5,0
Dep14	0,2 ± 0,4	2,4 ± 2,7	0,4 ± 0,6	0,2 ± 0,4	5,0 ± 5,3	6,0 ± 4,7
Dep28	0,2 ± 0,3	2,4 ± 3,1	0,3 ± 0,5	0,2 ± 0,3	3,8 ± 2,2	6,8 ± 4,8
Dep42	0,1 ± 0,3	1,3 ± 1,2	0,5 ± 0,5	0,0 ± 0,2	5,3 ± 3,3	7,0 ± 4,0
Dep56	0,5 ± 0,6	2,3 ± 1,7	0,2 ± 0,3	0,2 ± 0,4	5,6 ± 3,0	9,0 ± 3,6
Dep84	0,4 ± 0,4	2,2 ± 2,4	0,3 ± 0,4	0,2 ± 0,4	4,5 ± 4,3	7,4 ± 7,2

Dados expressos em médias ± DP

ANOVA pós teste de Dunnett

Letras indicam diferenças significativas entre os grupos (a, b)

Para *G. brasiliensis*, houve um aumento nos danos ao DNA, tanto no sangue quanto no fígado após 42 dias de depuração, com redução do dano após 56 dias ( $p < 0,05$ ; Fig. 4 A-B). Para *O. niloticus*, o aumento da porcentagem de fragmentação do DNA ocorreu em 42 dias para o sangue e 56 dias para o fígado. Foi possível observar redução no dano após 84 dias para ambos os tecidos avaliados ( $p < 0,05$ ; Fig. 4 C-D).

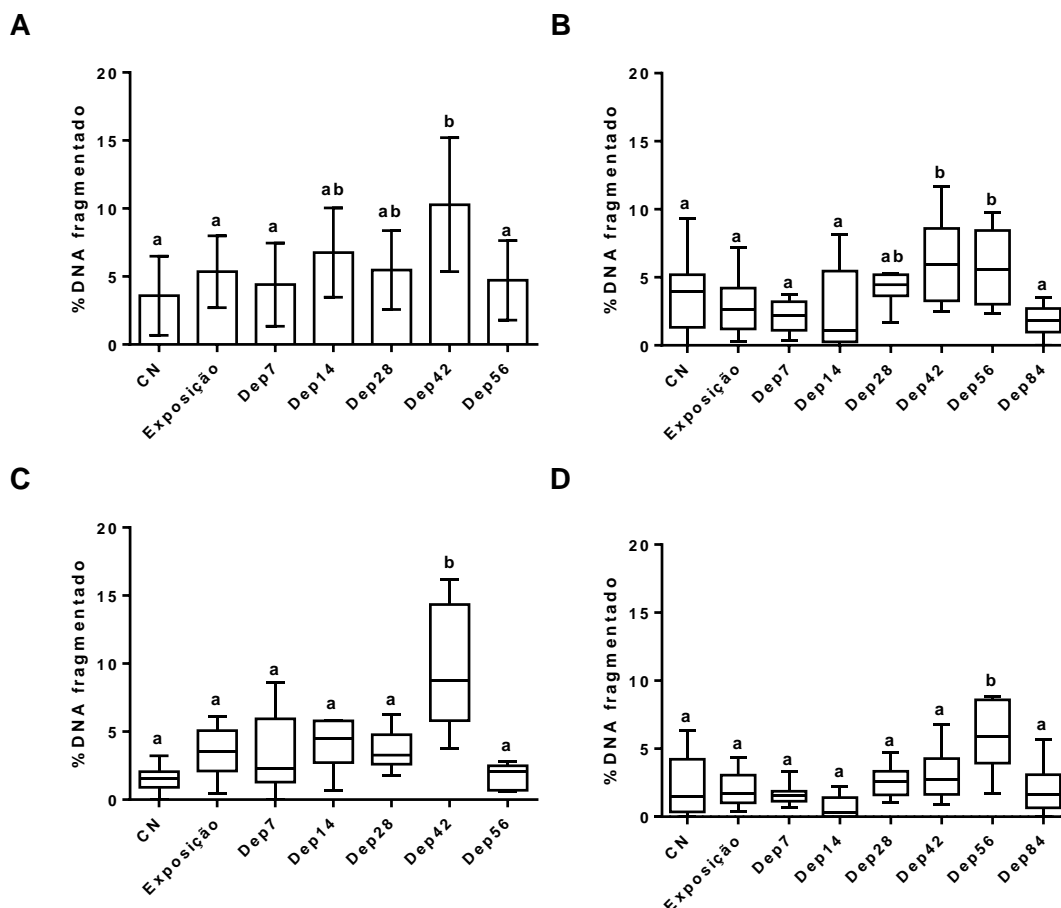


Figura 4 - % DNA na cauda em sangue e fígado de *G. brasiliensis* (A-B) e *O. niloticus* (C-D) avaliado pelo ensaio Cometa. N=168. ANOVA (média ± DP), Kruskal-Wallis (mediana e quartis). Letras indicam diferenças significativas entre os grupos (a, b).

Para *G. brasiliensis*, não foram observadas diferenças entre os grupos para a SOD, CAT e GSH ( $p > 0,05$ ), mas o aumento da atividade foi significativo para GPx e GST após 42 e 56 dias de depuração, respectivamente. Neste mesmo período observamos uma diminuição na atividade da EROD ( $p < 0,05$ ; Fig. 5). Para *O. niloticus*, SOD, CAT, GPx e GST diminuíram a atividade após 7 dias de depuração ( $p < 0,05$ ). SOD, CAT e GPx mantiveram valores semelhantes até o final do experimento em 84 dias ( $p > 0,05$ ). A concentração de GSH teve uma diminuição após a exposição ao cobre e manteve valores semelhantes durante todo o experimento, com um leve aumento em 28 e 56 dias ( $p < 0,05$ ). A atividade da EROD aumentou após 7 dias de depuração, e diminuiu a atividade somente em 84 dias ( $p < 0,05$ ). A GST apresentou um aumento em 42 dias e um novo decréscimo de atividade em 84 dias ( $p < 0,05$ ; Fig. 6).

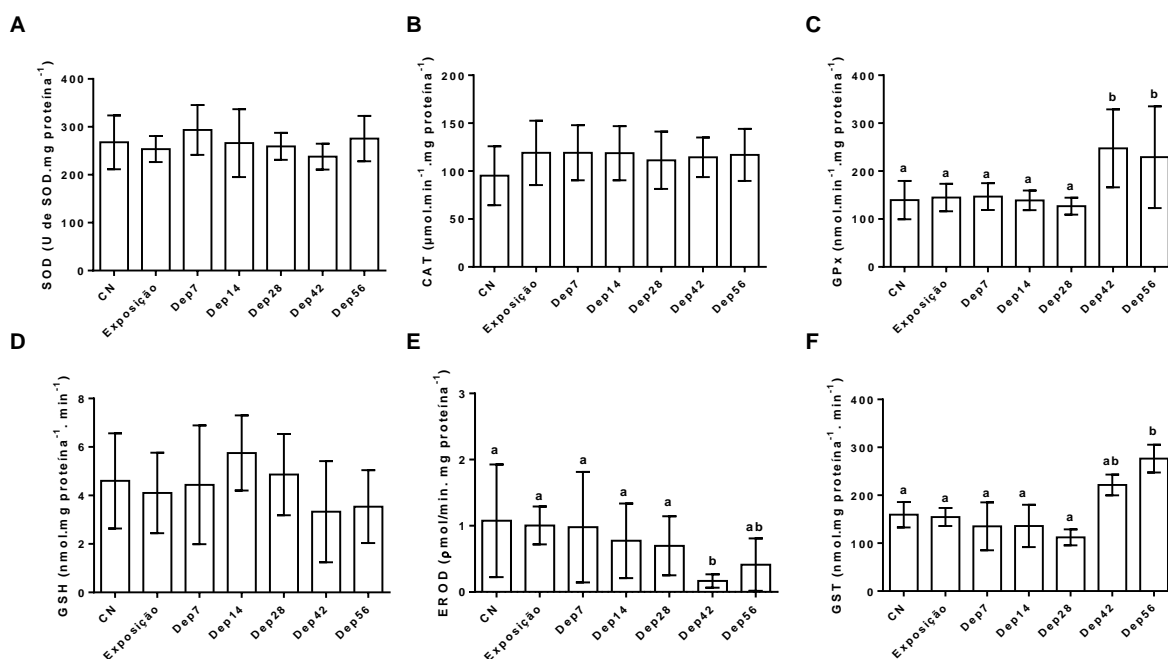


Figura 5 - Alterações enzimática avaliadas em *G. brasiliensis* expostos ao cobre e sujeitos a depuração. N=72. ANOVA (média ± DP). Letras indicam diferenças significativas entre os grupos (a, b).

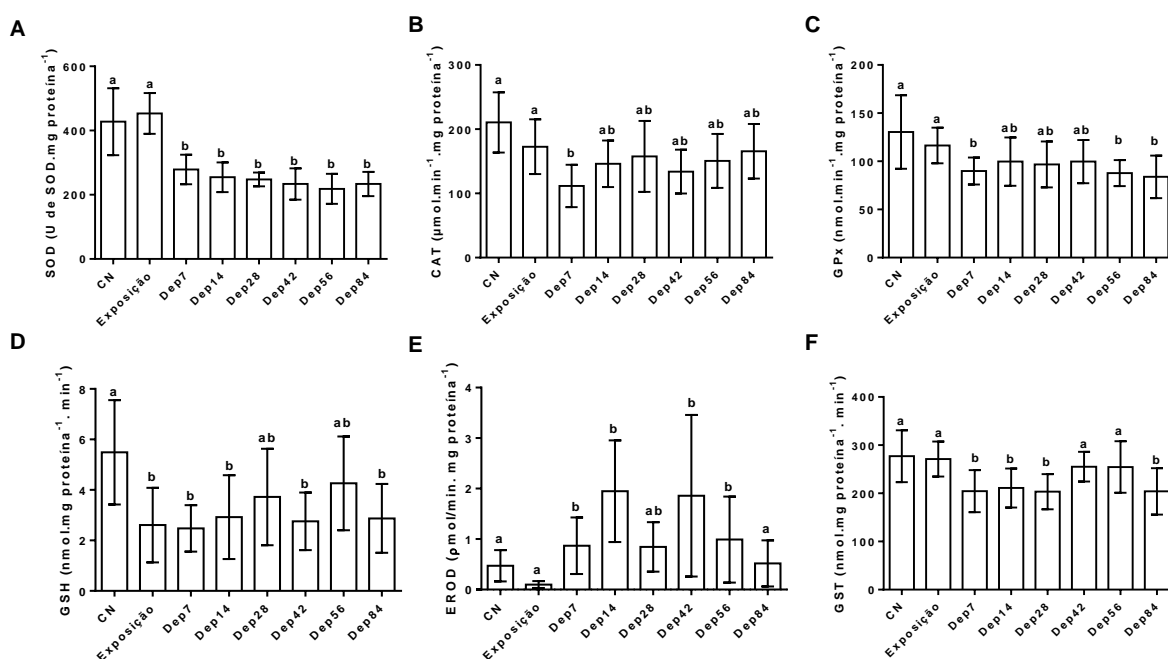


Figura 6 - Alterações enzimática avaliadas em *O. niloticus* expostos ao cobre e sujeitos a depuração. N=96. ANOVA (média ± DP). Letras indicam diferenças significativas entre os grupos (a, b)

Não foram observadas diferenças entre os grupos no índice de Bernet para a espécie *G. brasiliensis* ( $p>0,05$ ). No entanto, este índice apresentou diferença entre grupos para *O. niloticus* (Tab. 4). Nesta espécie houve um aumento do índice após a

exposição ao cobre e os índices voltaram a diminuir após 28 dias depuração ( $p < 0,05$ ). Pela análise foi possível observar a ocorrência de diferentes alterações, sendo a necrose a mais frequente. Considerando outras alterações com fator de importância intermediário, observamos infiltrações leucocitárias, vacuolizações e granulomatoses. Para alterações de menor importância patológica foram contabilizadas as congestões. As lesões estão descritas de acordo com a ocorrência dentro de cada grupo na Tabela 4.

Tabela 4 - Ocorrência de alterações histopatológicas em *G. brasiliensis* e *O. niloticus* expostos ao cobre.

	Necrose	Infiltração leucocitária	Vacuolização	Granulomatose	Congestão	Índice de Bernet
<i>G. brasiliensis</i>						
CN	80 %	20 %	0 %	20 %	50 %	9,4 ± 8,28
Exposição	60 %	70 %	20 %	0 %	40 %	10 ± 6,04
Dep7	40 %	50 %	30 %	0 %	70 %	8,4 ± 7,47
Dep14	50 %	20 %	30 %	20 %	40 %	7,2 ± 8,44
Dep28	40 %	10 %	20 %	20 %	40 %	4,2 ± 5,29
Dep42	80 %	20 %	30 %	30 %	50 %	8,67 ± 5,61
Dep56	100 %	20 %	0 %	30 %	30 %	5,67 ± 5,57
<i>O. niloticus</i>						
CN	60 %	20 %	0 %	20 %	30 %	4,75 ± 5,23ab
Exposição	60 %	70 %	0 %	0 %	30 %	10 ± 3,7b
Dep7	40 %	40 %	20 %	0 %	30 %	5,11 ± 6,41ab
Dep14	50 %	20 %	20 %	20 %	30 %	5,11 ± 7,29ab
Dep28	50 %	20 %	0 %	40 %	30 %	3,56 ± 3,71a
Dep42	50 %	10 %	0 %	20 %	40 %	2,67 ± 3a
Dep56	60 %	10 %	0 %	20 %	40 %	2,22 ± 3,07a
Dep84	50 %	40 %	0 %	20 %	40 %	3,56 ± 3,58a

Dados do índice de Bernet expressos em médias ± DP.

Letras indicam diferenças significativas entre os grupos (a, b).

#### 4.4.4 Abordagem multivariada

A PCA baseada nas respostas dos biomarcadores no fígado foi realizada com o objetivo de obter uma visão unificada das respostas das duas espécies. Para *G. brasiliensis*, os dados foram explicados até o terceiro componente (Fig. 7). O primeiro componente agrupou 26,48% da variabilidade dos dados. Este componente foi positivamente correlacionado com a GST, GPx, Histopatologia e danos no DNA do



fígado ( $p < 0,05$ ; Tab. 5). O segundo componente agrupou menor porção da variabilidade dos dados (21,78%) sendo positivamente correlacionado com a CAT, GPx, SOD e GSH e negativamente correlacionado com os danos no DNA ( $p < 0,05$ ; Tab. 5). O terceiro componente agrupou 15.69% da variabilidade e foi negativamente correlacionado com CAT e Histopatologia ( $p < 0,05$ ; Tab. 5)

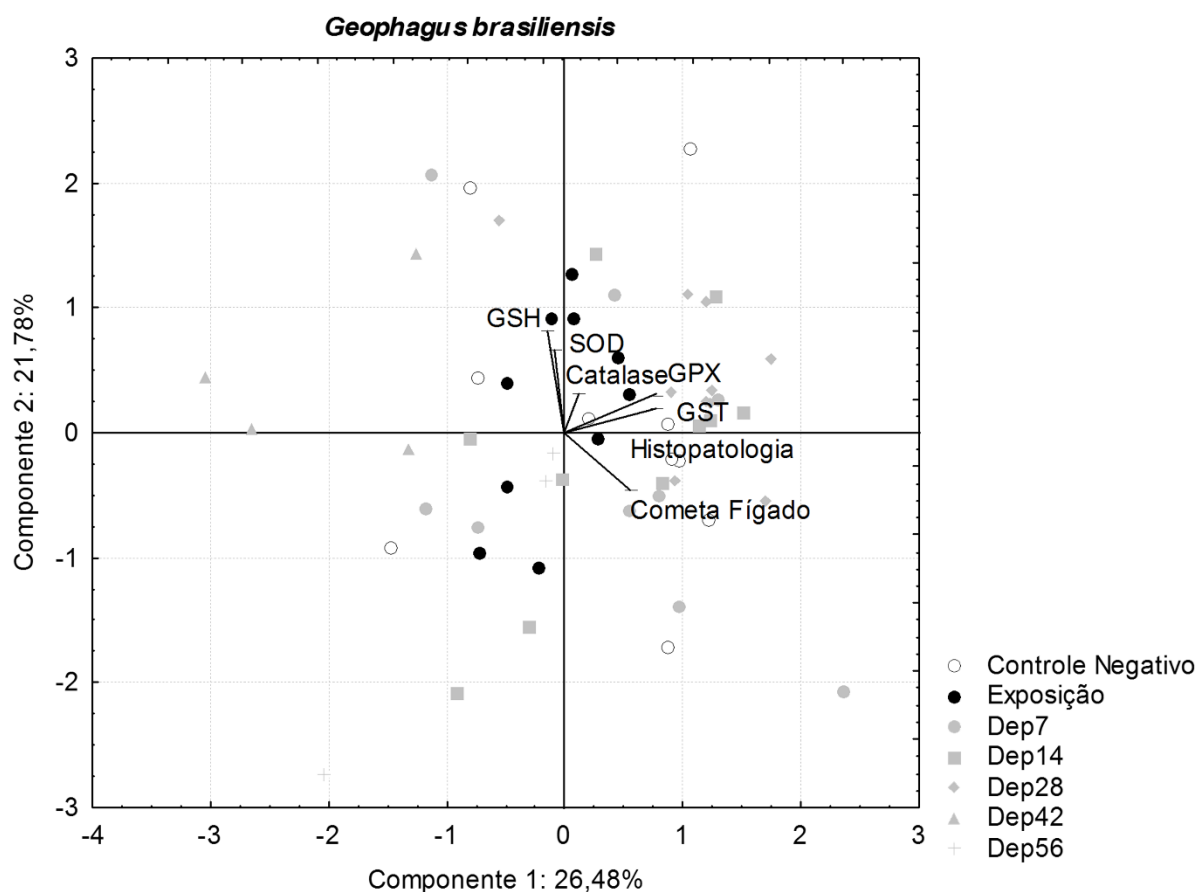


Figura 7 - Análise de componentes principais (PCA) nos biomarcadores do fígado de *G. brasiliensis* expostos ao cobre e sujeitos a depuração.

Para *O. niloticus*, os dados da PCA foram explicados até o segundo componente (Fig. 8). O primeiro componente agrupou 39,14% da variabilidade dos dados, sendo positivamente correlacionado com CAT, GST, GPx, SOD e GSH (Tab. 5). O segundo componente agrupou 17,7% da variabilidade dos dados. Este componente foi positivamente correlacionado com a Histopatologia e negativamente correlacionado com os danos no DNA do fígado (Tab. 5).

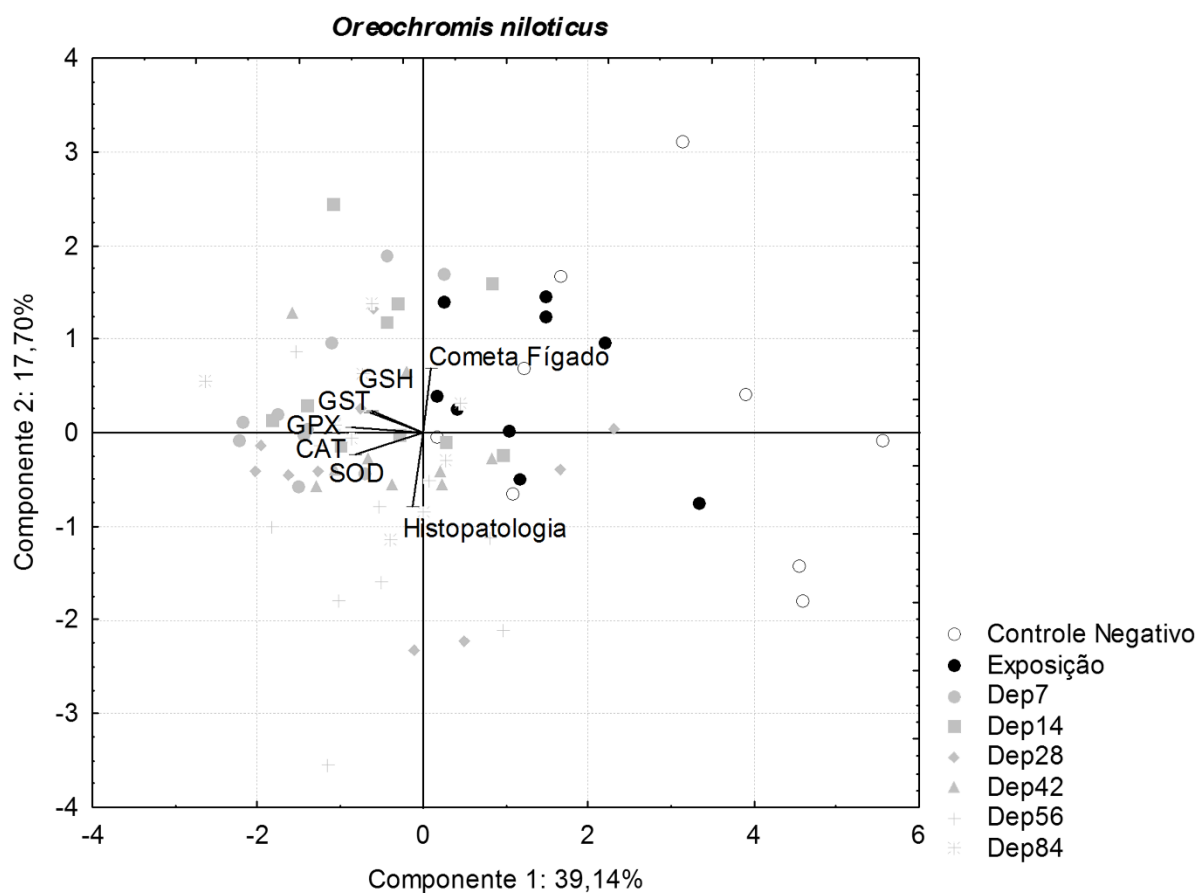


Figura 8 - Análise de componentes principais (PCA) nos biomarcadores do fígado de *O. niloticus* expostos ao cobre e sujeitos da depuração.

Tabela 5 – Correlação entre os biomarcadores no fígado das duas espécies com os componentes da PCA.

	<i>G. brasiliensis</i>			<i>O. niloticus</i>	
	Componente 1	Componente 2	Componente 3	Componente 1	Componente 2
SOD	-0.08	0.66*	0.08	-0.83*	-0.23
CAT	0.12	0.31*	-0.79*	-0.67*	-0.006
GPX	0.78*	0.30*	0.24	-0.88*	0.07
GSH	-0.15	0.81*	0.13	-0.63*	0.23
GST	0.78*	0.19	0.24	-0.64*	0.21
Histopatologia	0.53*	0.006	-0.56*	0.09	0.69*
Cometa Fígado	0.55*	-0.46*	0.07	-0.12	-0.78*

\*  $p < 0,05$

## 4.5 DISCUSSÃO

O presente trabalho as respostas biológicas de duas espécies a exposição e depuração do cobre, demonstrando que este elemento é capaz de permanecer por muito tempo nos organismos e induzir alterações enzimáticas e no DNA, principalmente devido ao potencial para bioacumular nos tecidos (FAZIO et al., 2014; GROSELL, 2011; SEVCIKOVA et al., 2016).

O uso de índices biométricos como o fator de condição e o índice hepatossomático em bioensaios pode ser uma ferramenta interessante para avaliar a influência de processos bióticos sobre os organismos e que podem ter relação com outras variáveis testadas (AL-GHAIS, 2013). Neste trabalho, não foram observadas diferenças entre os grupos em relação ao fator de condição, visto que os peixes utilizados no experimento apresentavam tamanhos semelhante e receberam o mesmo alimento durante o período de aclimação e experimentação. O fator de condição é conhecidamente relacionado com a qualidade do alimento que o organismo recebe e com o seu estado reprodutivo (BAGNASCO et al., 1991). Também foi avaliado neste trabalho o índice hepatossomático (IHS), que é uma variável relacionada principalmente à reserva de energia, pode ser influenciada por uma série de condições (AL-GHAIS, 2013). Dentre elas está a exposição a contaminantes ambientais, e alguns estudos relacionaram o aumento do IHS como um marcador de estresse hepático (AL-GHAIS, 2013; AZEVEDO et al., 2009; GÜL et al., 2004). Os espécimes de *G. brasiliensis* apresentaram uma diminuição do IHS durante os 7 dias de exposição e *O. niloticus* apresentou uma diminuição em 56 dias, diferentemente do que era atribuído na literatura como estresse hepático. No entanto, durante a condução deste experimento, os acarás mostraram sinais claros de estresse de manejo, visto que os peixes não se alimentaram durante os 7 dias de exposição ao cobre, mesmo com a oferta de alimento, inclusive os peixes do controle negativo, diferentemente do que ocorreu com a tilápia. Por isso, acreditamos que tanto o fator de condição quanto o IHS não são considerados parâmetros sensíveis para avaliar a exposição ao cobre nestas espécies.

Outra forma de avaliar as condições as quais os organismos estão sujeitos em relação a presença de agentes tóxicos é quantificá-los em tecidos-alvo (VAN DER OOST; BEYER; VERMEULEN, 2003). Neste experimento, utilizamos o cobre na forma de  $\text{CuSO}_4$ , que é a forma mais comumente utilizada em ambientes aquáticos, sendo

importante na aquicultura para o controle de algas, ectoparasitas e infecções bacterianas (BOONE et al., 2012). Estudos anteriores a este colocam o cobre como um metal que bioacumula nos tecidos de organismos aquáticos (OECD, 2014). A bioacumulação do cobre depende não só do metabolismo do organismo, mas também das condições abióticas do ambiente onde ele está exposto. Çogun e Kargin (2004) mostraram a influência do pH na bioacumulação do cobre em peixes e sugeriram que em pH mais ácido o cobre tende a estar mais disponível para bioacumular. No presente trabalho observamos que o cobre bioacumulou principalmente no fígado dos peixes e ainda que *O. niloticus* bioconcentrou mais cobre no fígado à medida que este foi metabolizado pelo organismo, atingindo os valores mais altos após 84 dias de depuração em água limpa. Durante a depuração a longo prazo, existe uma tendência progressiva ao longo do tempo para níveis de metais estabilizarem ou diminuírem na maioria dos órgãos, porém, eles tendem a aumentar no fígado, rim e esqueleto (GROSELL, 2011). No entanto, o mesmo fenômeno não foi observado em *G. brasiliensis*, mostrando que as espécies utilizadas no experimento metabolizam o cobre de forma diferente.

O fígado é considerado o principal órgão na metabolização do cobre (OECD, 2014) e por isso era esperado que os valores fossem mais altos neste tecido. Adicionalmente, foram encontradas baixas concentrações de cobre no músculo das duas espécies, conforme já havia sido observado em outros estudos com outras espécies de peixe (GROSELL; WOOD; WALSH, 2003; KALAY; CANLI, 2000). Com relação ao cobre presente na água, as concentrações analisadas foram mais baixas que as nominais, pois os peixes foram expostos a 65 µg/L de CuSO<sub>4</sub> que continha uma porcentagem de 25,4% de Cu inorgânico. Ainda, quando o ambiente se encontra em pH acima de 6,0, como o observado neste experimento, o Cu<sup>2+</sup> pode ser reduzido a Cu<sup>+</sup> e ser precipitado junto a carbonatos, na forma de CuCO<sub>3</sub>, e/ou à matéria orgânica (OECD, 2014). Por isso, estes valores baixos observados podem ser devido a essa reação. Mesmo assim, as quantificações demonstraram que o cobre foi absorvido pelos organismos causando os efeitos que serão ainda discutidos.

Alguns trabalhos demonstraram a relação entre a ocorrência de alterações morfológicas nucleares e a exposição a xenobióticos, e também atribuíram a sua formação a mecanismos independentes dos danos no DNA (CARRASCO; TILBURY; MYERS, 1990; ERGENE-GÖZÜKARA et al., 2007). O teste do micronúcleo utiliza o sangue como tecido alvo, sendo este tecido formado por diversos tipos celulares. O

tipo celular contabilizado foram os eritrócitos, que são células que apresentam um baixo índice mitótico, por isso é esperado que a alteração na frequência de células anormais seja observada somente alguns dias após a exposição, pois nesta técnica avaliamos uma consequência da alteração nas células precursoras do eritrócito. Este efeito foi observado em *G. brasiliensis*, que apresentaram uma diminuição nas alterações morfológicas nucleares somente após 7 dias de depuração.

Adicionalmente, este trabalho utilizou o ensaio Cometa, que é considerado um teste mais sensível para avaliar os danos no DNA. Foi interessante notar que as duas espécies apresentaram respostas semelhantes durante todo o experimento tanto para o sangue quanto para o fígado. O aumento do dano no DNA nas células sanguíneas foi observado no período entre 42 e 56 dias, e este valor retomou às condições normais após 56 dias para o *G. brasiliensis* e apenas em 84 dias para *O. niloticus*. Acredita-se as diferenças quanto a capacidade de metabolização do cobre nestas espécies seja o principal fator envolvido no “delay” da restauração dos níveis normais de danos no DNA por *O. niloticus*. Trabalhos anteriores demonstraram o potencial genotóxico do cobre, inclusive nas espécies utilizadas neste trabalho, porém sem testar o efeito na depuração a longo prazo (BENINCÁ et al., 2012; ÇAVAŞ; GARANKO; ARKHIPCHUK, 2005; CORONA-RIVERA et al., 2007; GABBIANELLI et al., 2003; OBIAKOR et al., 2010; PRÁ et al., 2008).

Em *O. niloticus*, foi observado várias enzimas do sistema antioxidante diminuíram a após 7 dias de depuração. SOD, CAT e GPx são criticamente importantes na transformação dos radicais em moléculas não reativas, e sofreram alterações originadas da exposição ao cobre de forma tardia. Sugere-se então, que neste período houve inibição do sistema enzimático antioxidante. Foi observado que mesmo após a depuração de 84 dias estas enzimas mantiveram valores de atividade baixos, mostrando que os efeitos do podem ser persistentes. Porém, observamos que o *G. brasiliensis* não teve o sistema antioxidante alterado da mesma forma pelo cobre, mas observamos que enzimas como a SOD e a CAT apresentam baixa atividade para esta espécie em todos os grupos. Ainda sobre as enzimas antioxidantes, sabe-se que a primeira defesa contra o dano oxidativo envolve a atividade da SOD na conversão de  $O_2^{\cdot-}$  em  $H_2O_2$ , e posteriormente a CAT e/ou a GPx que degradam  $H_2O_2$  em água e oxigênio. Um estudo sugeriu que o aumento de  $O_2^{\cdot-}$  causado pela inibição da SOD pode inibir a atividade da CAT em caso de produção excessiva (PANDEY et al., 2003).

Foi observado também uma diminuição na GSH após a exposição que pode estar relacionada com a diminuição na GPx e também ao fato do cobre afetar os níveis intracelulares de  $\text{Ca}^{2+}$  livre e com isso diminuir a quantidade de glutathionas intracelulares (KRUMSCHNABEL; SCHWARZBAUM; WIESER, 1999). Com relação ao *G. brasiliensis*, observamos que o sistema antioxidante não sofreu alteração da mesma forma pelo cobre, mas observamos que enzimas como a SOD e a CAT apresentam baixa atividade para esta espécie em todos os grupos.

Considerando os biomarcadores relacionados a biotransformação, a EROD participa do metabolismo de fase I onde ocorrem as reações de oxidação e redução dos xenobióticos e a GST atua no metabolismo de fase II onde ocorrem as reações de conjugação (REYNAUD; RAVETON; RAVANEL, 2008). A EROD apresentou resultados distintos entre as espécies avaliadas, sendo inibida após 42 dias de depuração para *G. brasiliensis* e ativada após 7 dias de depuração para *O. niloticus*. O cobre age como um agente inibitório da atividade da EROD em peixes, principalmente em células do fígado (FAVERNEY et al., 2000). No entanto, a interação do cobre com glutathiona no fígado também tem papel importante na regulação da atividade da EROD (GHOSH; GHOSH; RAY, 2001). A GST também apresentou resultados distintos para as duas espécies, com a indução desta enzima em 42 dias de depuração em *G. brasiliensis* e inibição com 7 dias de depuração em *O. niloticus*. Sabe-se que a GST pode apresentar diferentes comportamentos após a exposição ao cobre. Por exemplo, Ahmad et al. (2005) mostraram que baixas concentrações de cobre podem inibir a atividade da GST, enquanto altas concentrações podem induzir sua atividade. Como foi observado nas respostas dos outros biomarcadores, estas espécies metabolizaram o cobre de forma diferente, e sugerimos que este fator tenha sido crucial nas diferenças no metabolismo de biotransformação.

Na análise histopatológica do fígado, observamos um aumento da ocorrência de alterações através do índice de Bernet em *O. niloticus* após a exposição ao cobre e este índice só diminuiu após 28 dias de depuração. Em *G. brasiliensis*, os valores se mantiveram semelhantes durante todo o experimento. A histopatologia avalia alterações causadas por xenobióticos em um nível intermediário de organização biológica (MYERS et al., 1998). Por isso, diferentemente de outras respostas avaliadas neste trabalho, este biomarcador pode ser considerado uma análise de um prejuízo já consolidado ao organismo. Por exemplo, a necrose foi a alteração mais

frequente entre os peixes avaliados e representa uma alteração irreversível que pode também estar relacionada a inibição de diversas enzimas, alterações da membrana celular e o aumento do estresse oxidativo (OLIVEIRA RIBEIRO et al., 2002). Quando consideramos os valores observados no índice de Bernet para as duas espécies, é possível notar que os valores encontrados em *O. niloticus* após a depuração são menores do que os encontrados para *G. brasiliensis*. Desta forma, sugerimos novamente que o metabolismo da tilápia é mais eficiente que o do acará em reduzir os danos provocados pela exposição ao cobre.

Na PCA observamos as respostas integradas dos biomarcadores avaliados no fígado das duas espécies, e nota-se que o primeiro eixo das duas PCAs se correlacionou com os resultados obtidos para a GST e GPx, só que positivamente nos acará e negativamente nas tilápias. O agrupamento das respostas dos biomarcadores participantes da metabolização das glutathionas nas duas espécies sugere a dependência deste mecanismo na eliminação do cobre e também acredita-se que haja relação na resposta destes biomarcadores, pois eles são regulados pela glutathione (AHMAD et al., 2005; CALADO et al., 2017; GUILHERME et al., 2008). Para *G. brasiliensis*, também foi possível notar uma correlação entre o ensaio cometa, e a enzimas dependentes de GSH com a histopatologia, mostrando que alterações nos níveis sub-celulares podem ocasionar consequências em níveis de organização biológica maiores (HAMZA-CHAFFAI, 2014). Em *O. niloticus*, observamos que o primeiro componente 1 agrupou todas as enzimas avaliadas no fígado de forma semelhante e sempre relacionadas aos grupos da depuração. Além disso, no segundo componente, observamos que o ensaio cometa e a histopatologia tiveram respostas distintas. Considerando estes fatos mencionados, podemos inferir novamente que os sistemas enzimáticos agiram de forma a proteger o fígado deste peixe de alterações mais severas como necroses e inflamações, principalmente durante o período de depuração. Mesmo assim, ainda foi possível observar alterações no nível de DNA, visto que o ensaio cometa é um teste mais sensível a exposição aos metais.

#### 4.6 CONCLUSÕES

Em conclusão, os resultados demonstraram que os tempos de depuração de 56 dias para o *G. brasiliensis* e 84 dias para *O. niloticus* não foram suficientes para que estes organismos apresentem recuperação do estado de homeostase observado antes da exposição. O cobre produziu respostas biológicas distintas em duas espécies

de ciclídeos, ainda que ambas sejam afetadas por esta exposição. Foi observado que a tilápia é capaz de ativar diversos sistemas enzimáticos durante a depuração, com o objetivo de reduzir os danos provocados pela contaminação como foi observado na análise histopatológica. Estes resultados podem servir como base para compreender como o cobre afeta diferentemente as espécies de peixe, principalmente aquelas que apresentam interações ecológicas no campo, como as espécies utilizadas neste trabalho.



## 5 CAPÍTULO II

### **METABOLISMO DEPENDENTE DE METALOTIONEÍNAS E DANOS EM MACROMOLÉCULAS CAUSADOS PELO COBRE EM PEIXES**

Gustavo Souza Santos<sup>1</sup>, Flávio Henrique Tincani<sup>1</sup>, Mario Junior Nadaline Barbosa<sup>1</sup>,  
Sabrina Loise de Moraes Calado<sup>2</sup>, Cinthia Eloise Domingues<sup>3</sup>, Helena Cristina Silva  
de Assis<sup>2</sup>, Sandro Xavier Campos<sup>3</sup>, Marta Margarete Cestari<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Departamento de Genética, Centro Politécnico, Universidade Federal do Paraná,  
Curitiba, Brasil

<sup>2</sup> Departamento de Farmacologia, Centro Politécnico, Universidade Federal do  
Paraná, Curitiba, Brasil

<sup>3</sup> Grupo de Pesquisa em Química Analítica Ambiental e Sanitária, Universidade  
Estadual de Ponta Grossa, Ponta Grossa, Brasil

## 5.1 RESUMO

O presente estudo investigou a indução de metalotioneínas em vários tecidos e os danos em macromoléculas de duas espécies de ciclídeos expostas ao cobre e sujeitas a vários períodos de depuração (7, 14, 28, 42, 56 e 84 dias). Para isso, foram quantificadas as metalotioneínas no fígado, rim e brânquias, e foram analisadas a lipoperoxidação e carbonilação proteica no fígado. Adicionalmente, foram realizadas análises químicas do cobre no fígado e no músculo dos peixes. Para *G. brasiliensis*, os níveis de cobre no fígado aumentaram após a exposição e se mantiveram em níveis similares durante todo o período de depuração. Além disso, não foram observadas diferenças significativas entre os grupos para a concentração de metalotioneínas no fígado e no rim, embora tenha sido observada uma diminuição nas brânquias após 7 dias de depuração. Para *O. niloticus*, as concentrações de cobre no fígado aumentaram após a exposição e aumentaram continuamente durante a depuração, atingindo 33 µg/g em 84 dias. Juntamente houve um aumento de metalotioneínas no fígado após 56 dias de depuração. Nas brânquias, houve um aumento da metalotioneínas logo após os 7 dias de exposição ao cobre, contudo estes valores voltaram ao normal após 14 dias de depuração. Ainda foram detectados aumento da lipoperoxidação em *O. niloticus* e carbonilação proteica em *G. brasiliensis*. Demonstramos que *O. niloticus* depende da produção de metalotioneínas no fígado e nas brânquias para metabolizar o cobre, diferentemente de *G. brasiliensis*.

## 5.2 INTRODUÇÃO

O cobre é um dos metais mais abundantes na natureza e essencial para o funcionamento de diversos complexos enzimáticos nos organismos (PELGROM et al., 1995). No entanto, quando se apresenta em grandes concentrações pode apresentar atividade tóxica e bioacumular nos tecidos (OECD, 2014). O fígado é o principal alvo dos estudos que avaliam os efeitos deletérios causados pelo cobre em peixes (SIMONATO et al., 2016; UREN WEBSTER et al., 2017). No fígado, o cobre se liga à ceruloplasmina quando chega a corrente sanguínea para ser distribuído por todo organismo, alterando o funcionamento e a estrutura de diversas biomoléculas como proteínas e lipídeos, afetando diretamente os padrões de homeostase celular (CHATTERJEE et al., 2016; OECD, 2014). No rim, o cobre pode induzir dano oxidativo e alterar a expressão de enzimas do sistema antioxidante (AHMAD et al., 2005; MANSOURI et al., 2013). A brânquia é considerada o principal órgão de entrada de

cobre nos peixes (JEZIERSKA; WITESKA, 2006), podendo sofrer bioacumulação, alterações enzimáticas e alterações estruturais severas (CAVAŞ; ERGENE-GÖZÜKARA, 2005; MONTEIRO et al., 2009; SEVCIKOVA et al., 2016).

Dentre os principais mecanismos celulares induzidos pela exposição ao cobre encontramos as metalotioneínas. Estas proteínas apresentam baixo peso molecular, variando de 6 a 7 kDa e são ricas em cisteínas, o que confere a elas a capacidade de se ligar a íons metálicos (SHARIATI; SHARIATI, 2011). Devido a este potencial, as metalotioneínas agem de forma muito potente na detoxificação do cobre das células dos organismos, além de apresentarem alta estabilidade térmica (D'AURIA et al., 2001). A principal função das metalotioneínas é manter estáveis os níveis dos metais essenciais como o Cu e Zn no meio intracelular (VIARENGO et al., 1997). Além disso, estas proteínas podem atuar na proteção da célula contra metais que estejam em concentrações tóxicas (HAUSER-DAVIS et al., 2014). A indução da metalotioneína em peixes expostos a metais já foi reportado anteriormente, entretanto os mecanismos relacionados a regulação destes metais nos organismos ainda não estão completamente compreendidos (CHATTERJEE et al., 2016). É esperado que o fígado seja o órgão que apresente os maiores níveis de metalotioneínas, porém, a quantidade desta proteína pode variar muito nos organismos (FILIPOVIĆ; RASPOR, 2003). Trabalhos anteriores relataram a indução destas proteínas em outros tecidos como o rim, brânquias, cérebro, músculo e vesícula biliar de peixes (DE BOECK et al., 2003; FILIPOVIĆ; RASPOR, 2003; HAUSER-DAVIS et al., 2014). Além disso, estas proteínas também podem ser marcadores de estresse oxidativo devido a nucleofilicidade dos seus grupos sulfidrilas (VIARENGO et al., 2000).

As concentrações de metalotioneínas podem variar em relação ao tecido em que eles são avaliados, assim como variam muito em diferentes espécies de peixes (DE BOECK et al., 2003). Cada espécie apresenta algumas particularidades fisiológicas e bioquímicas que fazem com que o aporte de metais ocorra diferentemente (JEZIERSKA; WITESKA, 2006; VAN DER OOST; BEYER; VERMEULEN, 2003). *Geophagus brasiliensis* e *Oreochromis niloticus*, são espécies que apresentam muitas semelhanças morfológicas e fisiológicas, têm sido utilizadas frequentemente como modelos biológicos para a avaliação dos efeitos causados por metais (CHATTERJEE et al., 2016; MONTEIRO et al., 2009; RODRÍGUEZ-CEA et al.,

2006; RUAS et al., 2008). Além disso, estas espécies apresentam sobreposição de nichos e por isso competem no ambiente natural (LINDE et al., 2008).

Com base nisso, o presente estudo investigou a concentração de metalotioneínas em vários tecidos e os danos em macromoléculas de duas espécies de ciclídeos expostas ao cobre e sujeitas a vários períodos de depuração. Para isso, foram quantificadas as metalotioneínas no fígado, rim e brânquias, e foram analisadas a lipoperoxidação e carbonilação proteica no fígado. Adicionalmente, foram realizadas análises químicas da concentração de cobre no fígado e no músculo dos peixes. Finalmente, com estas informações, foram discutidos como as metalotioneínas agem em cada uma destas espécies e os mecanismos relacionados aos processos de detoxificação do cobre, além dos danos em lipídeos e proteínas causados por esta exposição.

## 5.3 MATERIAL E MÉTODOS

### 5.3.1 Desenho experimental

Adultos de *G. brasiliensis* (Acará) medindo  $11,02 \pm 1,36$  cm (média  $\pm$  DP) e pesando  $17,69 \pm 6,74$  g (média  $\pm$  DP) e de *O. niloticus* (Tilápia) medindo  $11,98 \pm 0,85$  cm (média  $\pm$  DP) e pesando  $26,4 \pm 4,61$  g (média  $\pm$  DP) foram coletados em uma piscicultura próxima a Curitiba. Os peixes foram aclimatados em água filtrada por 30 dias antes do início dos experimentos. Após esse período, 84 peixes de cada espécie foram expostos de forma hídrica semi-estática por 7 dias à concentração nominal de sulfato de cobre de  $65 \mu\text{g/L}$  (5 vezes o valor sugerido pelo CONAMA 357/2005 para águas de classe III), com renovação de 2/3 da água com o contaminante a cada 48 horas. Além destes, 12 peixes de cada espécie foram mantidos separadamente como controle negativo. A solução estoque de Sulfato de Cobre foi preparada dissolvendo  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  (CAS n° 7758-98-7, Sigma-Aldrich) em água deionizada na concentração de  $1 \text{ g/L}$ . A solução estoque foi diluída em água filtrada na concentração nominal para realizar os experimentos que foram conduzidos em aquários plásticos de 50 L com aeração constante, fotoperíodo 12h:12h, temperatura de  $21,4 \pm 0,8^\circ\text{C}$ , pH  $7,1 \pm 1$  e oxigênio dissolvido  $15,3 \pm 1,06 \text{ mg/L}$ . Neste experimento foi mantida a proporção de 3g de peixe por litro de água em cada aquário. Após 7 dias de exposição, 24 peixes (12 controle negativo e 12 expostos) de cada espécie foram eutanasiados com o auxílio de benzocaína 0,5%. O restante dos peixes submetidos à exposição ao

CuSO<sub>4</sub>•5H<sub>2</sub>O em água deionizada na concentração de 1 g/L, foram conduzidos para um sistema de fluxo contínuo de água filtrada. A cada período de depuração de 7, 14, 28, 42, 56 e 84 dias, foram retirados 12 exemplares de cada uma das espécies que foram eutanasiados e em seguida foram retirados o fígado, o rim, as brânquias e uma porção do músculo. Os tecidos retirados foram mantidos em -80 °C. O fígado foi utilizado para as análises da concentração de metalotioneínas (MT), de danos em lipídeos através da peroxidação lipídica (LPO) e danos em proteínas através da carbonilação proteica (PCO). O rim e as brânquias foram utilizadas para a análise de concentração de metalotioneínas. O fígado e o músculo foram utilizados para mensurar a concentração de cobre.

### 5.3.2 Quantificação de cobre

Após a digestão ácida do fígado e do músculo (USEPA, 2007b), o cobre foi quantificado por meio de um espectrômetro de absorção atômica em chama (FAAS, Varian, AA 240FS). O conteúdo de Cu inorgânico do CuSO<sub>4</sub> utilizado no experimento foi de 25,4%.

### 5.3.3 Concentração de metalotioneínas

As amostras de fígado, rim e brânquias foram homogeneizadas em tampão contendo 0,5 mM de PMSF (fluoreto de fenilmetilsulfonil), 0,01% de β-mercaptoetanol, 20 mM de Tris-HCl, 500 mM de sacarose, pH 8,6 e centrifugadas a 12600 xg por 30 minutos a 4 °C. 300 µL do sobrenadante e 342 µL de etanol-clorofórmio foram misturados e centrifugados a 6000 xg por 10 minutos a 4 °C. 490 µL do novo sobrenadante foi misturado a 1502 µL de etanol-HCl e mantidos a -20 °C por 1 hora. Após este período, o material foi centrifugado a 6000 xg por 10 minutos a 4 °C e as proteínas do pellet foram resuspendidas em 50 µL de NaCl a 250 mM. Então, foram adicionados a amostra 50 µL de EDTA (4 mM EDTA-2Na, 1M HCl) e 1000 µL de solução de Ellman (2 mM DTNB, 0,2 M fosfato de sódio, 2M NaCl) e foram centrifugados a 3000 xg por 5 minutos para determinar a absorbância a 412 nm. O conteúdo de sulfidrilas foi determinado pela comparação com a curva da glutathionas e a concentração de metalotioneínas foi calculada indiretamente considerando a concentração de 30% de cisteína-metalotioneína, conforme descrito para mexilhões (VIARENGO et al., 1997).

#### 5.3.4 Lipoperoxidação

As amostras de fígado foram misturadas com metanol e centrifugadas por 10 minutos a 9000 xg a 4 °C. 100 µL do sobrenadante foram adicionados a 900 µL da solução reação (100 mM de Xilenol Orange, 25 mM de Ácido sulfúrico, 4mM de Hidroxitolueno butilado, 250 mM de Sulfato ferroso amoniacal, e metanol 90%). Em seguida as amostras foram incubadas por 30 minutos e plaqueadas em uma microplaca. A análise foi realizada a 570 nm em um espectrofotômetro e os resultados foram expressos em µmoles de hidroxilas por mg de proteína. Os níveis de Lipoperoxidação foram avaliados através da concentração de hidroperóxidos no ensaio FOX (JIANG; HUNT; WOLFF, 1992).

#### 5.3.5 Carbonilação proteica

200 µL do sobrenadante das amostras de fígado foram misturadas a 800 µL de 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH) a 10 mM (preparado em ácido clorídrico a 2M). Tubos contendo o 2 M de ácido clorídrico sem DNPH foram utilizados como brancos. Os tubos foram misturados em vórtex por 5 minutos e mantidos a 30 °C por 1,5 hora. As proteínas foram precipitadas em 700 µL de ácido tricloacético a 28% e centrifugados a 9000 xg por 10 minutos. As proteínas do pellet foram lavadas três vezes e suspendidas em etanol/ acetato de etila (1:1), e misturadas em vórtex. As proteínas foram solubilizadas em 6 M de cloreto de guanidina e centrifugadas a 9000 xg por 5 minutos. O conteúdo de carbonilas foi determinado a 360 nm em um espectrofotômetro utilizando o coeficiente de absorção molar de  $2,1 \times 10^4 \text{ M}^{-1}.\text{cm}^{-1}$  para hidrazonas. Os dados foram expressos em µmoles de carbonilas por mg de proteína (LEVINE et al., 1990).

#### 5.3.6 Análise estatística

Todos os dados foram testados quanto a normalidade (Teste de Komogorov-Smirnov) e homocedasticidade (Teste de Bartlett). Visto que a hipótese a ser testada neste trabalho é unicaudal, foi aplicada uma ANOVA com pós teste de Dunnett a fim de observar as diferenças significativas dos grupos depuração e controle negativo em relação ao grupo exposto ao cobre, para todas as variáveis analisadas. Os dados que não atingiram os requisitos desta análise foram submetidos ao teste não paramétrico de Kruskal-Wallis com pós teste de Dunn. O nível de significância considerado foi de  $p < 0,05$ . Os *outliers* foram removidos pelo teste de ROUT com linha de corte em 5%.

Para a abordagem multivariada, os dados foram padronizados para que todos os dados biológicos de naturezas diferentes sejam considerados com a mesma importância. Foi conduzida uma análise de componentes principais (PCA) com todos os biomarcadores avaliados para verificar a interdependência entre os grupos e as respostas dos biomarcadores. Para isso, somente os indivíduos que possuíam todos os dados biológicos pareados foram considerados. O número de componentes interpretáveis foi feito segundo o critério de Kaiser-Guttman (BORCARD; GILLET; LEGENDRE, 2011). A correlação entre os eixos interpretáveis da PCA e as respostas dos biomarcadores foi analisada através do índice de Pearson.

## 5.4 RESULTADOS

### 5.4.1 Quantificação de cobre

Os resultados referentes a quantificação de cobre no fígado e músculo dos peixes estão compilados na Tabela 6. Para *G. brasiliensis*, os níveis de cobre no fígado aumentaram discretamente após a exposição e se mantiveram em níveis similares durante todo o período de depuração. No entanto, no músculo ocorreu redução do cobre após 42 dias de depuração. Para *O. niloticus*, os níveis de cobre no fígado aumentaram após a exposição e aumentaram continuamente durante a depuração, atingindo 33 µg/g em 84 dias. Já no músculo, os níveis de cobre aumentaram após a exposição e se mantiveram em níveis similares durante todo o período de depuração.

Tabela 6 – Concentração de cobre no fígado e músculo de *G. brasiliensis* e *O. niloticus* expostos ao cobre e sujeitos a depuração.

	<i>G. brasiliensis</i>		<i>O. niloticus</i>	
	Fígado (µg/g)	Músculo (µg/g)	Fígado (µg/g)	Músculo (µg/g)
CN	1,34 ± 0,16	0,1 ± 0,05	6,6 ± 0,12	<LD
Exposição	2,83 ± 0,67	0,11 ± 0,05	8,4 ± 2,6	0,12 ± 0,02
Dep7	1,18 ± 0,07	0,12 ± 0,09	13,99 ± 1,68	0,61 ± 0,07
Dep14	0,44 ± 0,09	0,21 ± 0,08	12,65 ± 1,69	0,65 ± 0,08
Dep28	1,52 ± 0,09	0,13 ± 0,03	15,05 ± 5,13	0,69 ± 0,13
Dep42	2,03 ± 0	0,001 ± 0	16,8 ± 0,06	0,72 ± 0
Dep56	1,02 ± 0,25	0,016 ± 0	19,89 ± 4,85	0,53 ± 0,08
Dep84	nd	nd	33,36 ± 5,27	0,56 ± 0

Dados expressos em Médias ± DP

<LD = abaixo dos limites de detecção

nd = não determinado

#### 5.4.2 Concentração de metalotioneínas

Para *G. brasiliensis*, não foram observadas diferenças significativas entre os grupos na concentração de metalotioneínas no fígado e no rim ( $p>0,05$ ), entretanto houve uma diminuição da concentração de metalotioneínas nas brânquias após 7 dias de depuração, e um aumento após 42 dias de depuração ( $p<0,05$ ; Fig. 9 A-C). Para *O. niloticus*, houve uma indução de metalotioneínas no fígado após 56 dias de depuração ( $p<0,05$ ), embora não tenha sido observadas diferenças entre os grupos para o rim ( $p>0,05$ ; Fig. 9 D-E). Nas brânquias, houve um aumento da concentração de metalotioneínas logo após os 7 dias de exposição ao cobre, contudo estes valores voltaram ao normal após 14 dias de depuração ( $p<0,05$ ; Fig. 9 F).



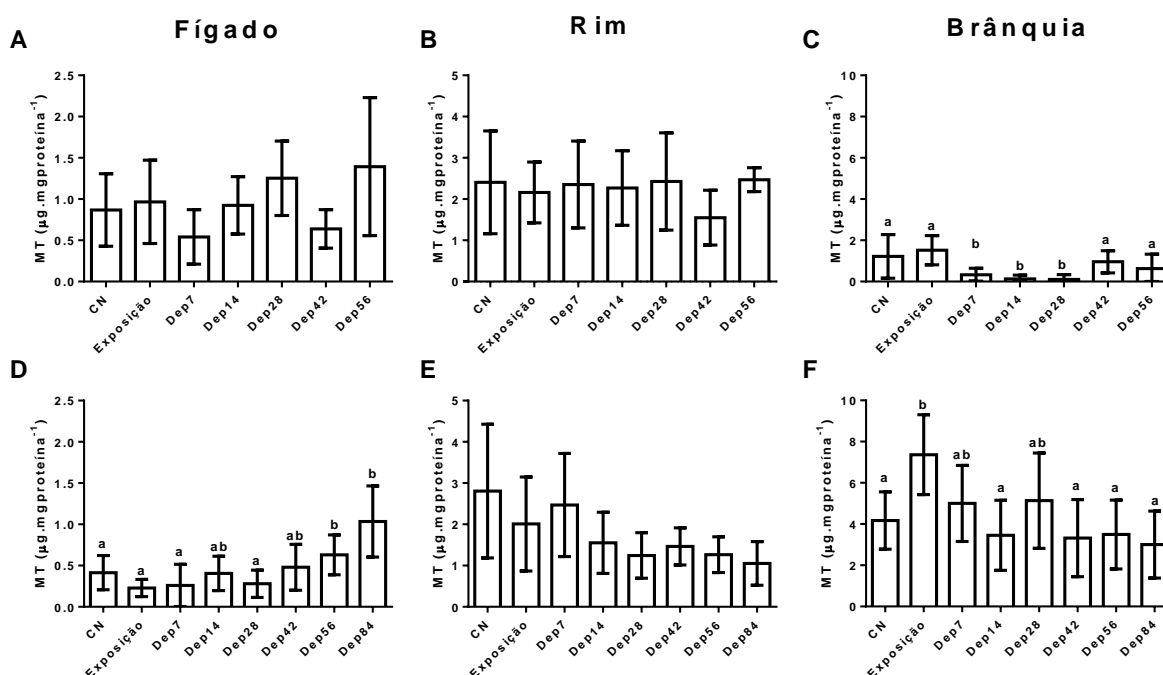


Figura 9 – Concentração de metalotioneínas no fígado (A, D), rim (B, E) e brânquias (C, F) de *G. brasiliensis* (A-C) e *O. niloticus* (D-F) após exposição ao cobre e depuração. N= 168. ANOVA com pós teste de Dunnett (Média  $\pm$  DP). Letras indicam diferenças significativas entre os grupos (a, b).

#### 5.4.3 Lipoperoxidação

Para *G. brasiliensis*, houve uma diminuição da lipoperoxidação após 14 dias de depuração e os valores se mantiveram baixos até o final do experimento em 56 dias ( $p < 0,05$ ; Fig. 10 A). Para *O. niloticus*, houve um aumento da lipoperoxidação aos 84 dias de depuração ( $p < 0,05$ ; Fig. 10 B).

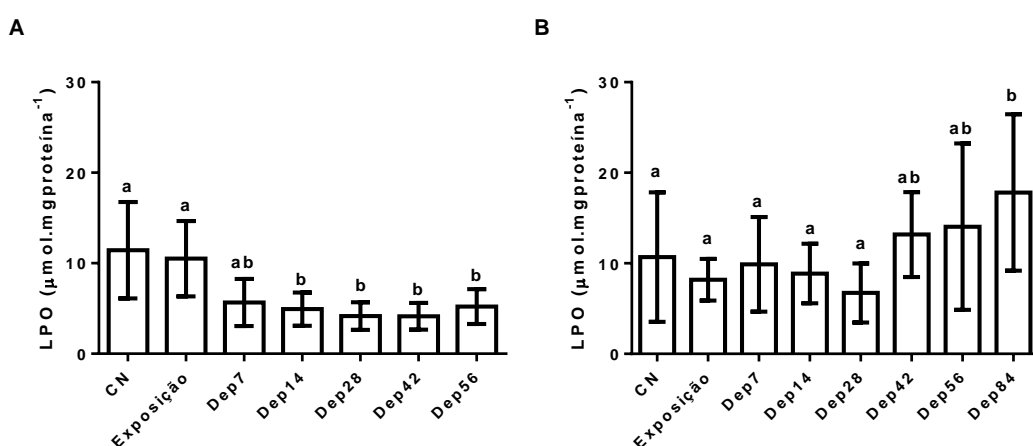


Figura 10 – Lipoperoxidação avaliada em *G. brasiliensis* (A) e *O. niloticus* (B) após exposição ao cobre e depuração. N= 168. ANOVA com pós teste de Dunnett (Média  $\pm$  DP). Letras indicam diferenças significativas entre os grupos (a, b).

#### 5.4.4 Carbonilação proteica

Para *G. brasiliensis*, houve um aumento da carbonilação de proteínas após 14 dias de depuração e com os valores sofrendo uma redução em 56 dias ( $p < 0,05$ ; Fig. 11 A). Para *O. niloticus*, houve um aumento da carbonilação de proteínas após exposição ao cobre e os valores retomaram os valores basais após 42 dias de depuração ( $p < 0,05$ ; Fig. 11 B).

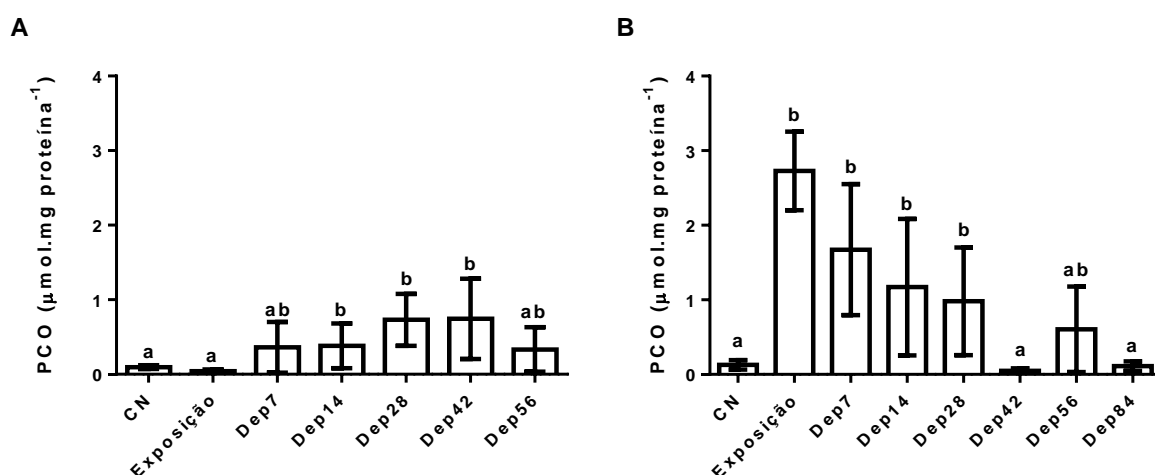


Figura 11 – Carbonilação proteica avaliada em *G. brasiliensis* (A) e *O. niloticus* (B) após exposição ao cobre e depuração. N= 168. ANOVA com pós teste de Dunnett (Média ± DP). Letras indicam diferenças significativas entre os grupos (a, b).

#### 5.4.5 Análise integrada

A PCA baseada nas respostas da indução de metalotioneínas, lipoperoxidação e carbonilação proteica foi realizada com o objetivo de obter uma visão unificada das respostas em cada uma das espécies. Para *G. brasiliensis*, os dados foram explicados até o segundo componente (Fig. 12). O primeiro componente agrupou 31,21% da variabilidade dos dados. Este componente foi positivamente correlacionado com a PCO e a MT no rim e negativamente correlacionado com a LPO e a MT na brânquia ( $p < 0,05$ ; Tab. 7). O segundo componente agrupou menor porção da variabilidade dos dados (21,37%) sendo negativamente correlacionado com a MT no fígado e na brânquia ( $p < 0,05$ ; Tab. 7).

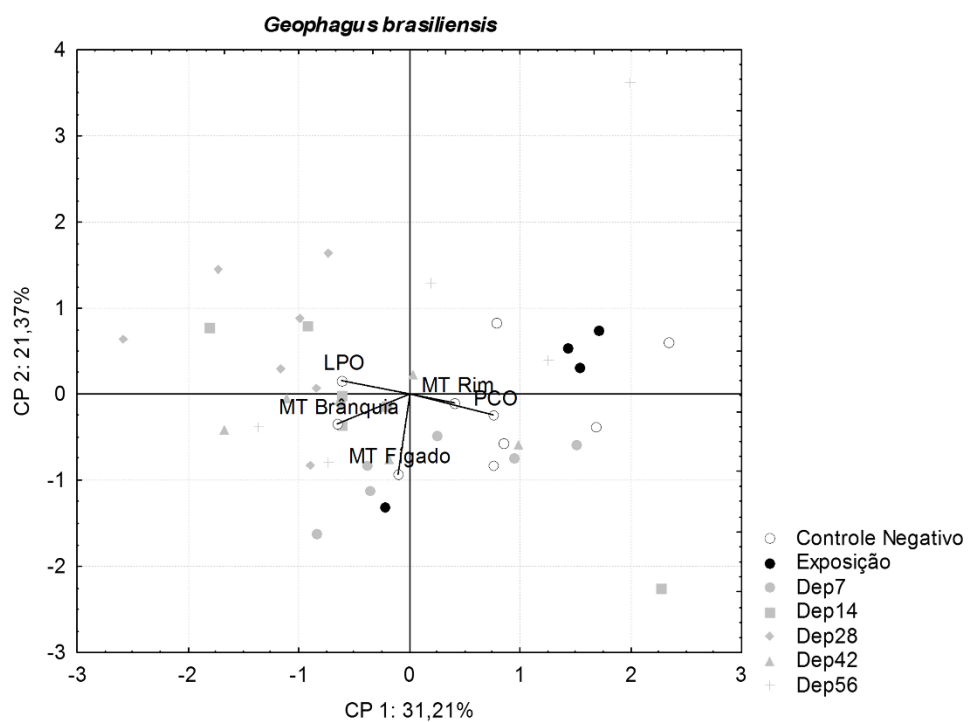


Figura 12 - Análise de componentes principais (PCA) nos biomarcadores do fígado de *G. brasiliensis* expostos ao cobre.

Para *O. niloticus*, os dados da PCA foram explicados até o segundo componente (Fig. 13). O primeiro componente agrupou 43,63% da variabilidade dos dados, sendo positivamente correlacionado com todas as variáveis testadas ( $p < 0,05$ ; Tab. 7). O segundo componente agrupou 20,45% da variabilidade dos dados e foi positivamente correlacionado com LPO, PCO, MT no fígado e no rim ( $p < 0,05$ ; Tab. 7).

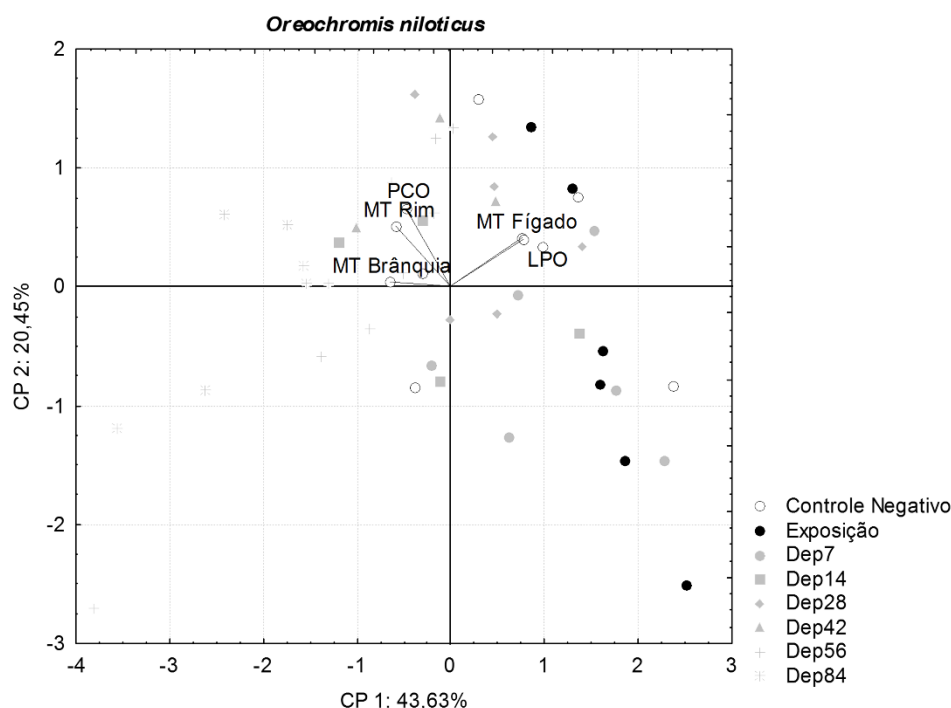


Figura 13 – Análise de componentes principais (PCA) nos biomarcadores do fígado de *O. niloticus* expostos ao cobre.

Tabela 7 – Índice de correlação de Pearson entre os biomarcadores avaliados nas duas espécies com o primeiro e segundo componentes da PCA.

	<i>G. brasiliensis</i>		<i>O. niloticus</i>	
	Componente 1	Componente 2	Componente 1	Componente 2
LPO	-0,61*	0,16	0,76*	0,41*
PCO	0,76*	-0,24	0,47*	0,66*
MT Fígado	-0,10	-0,92*	0,78*	0,40*
MT Rim	0,41*	-0,1	0,58*	0,51*
MT Brânquia	-0,65*	-0,35*	0,65*	0,04

\*  $p < 0,05$

## 5.5 DISCUSSÃO

O presente trabalho demonstrou como a metalotioneína é induzida em duas espécies de ciclídeos expostas ao cobre e sujeitas a vários períodos de depuração. Constatamos que a produção desta proteína ocorre em todos os tecidos avaliados nas duas espécies de peixe, como já havia sido observado em trabalhos anteriores (CHATTERJEE et al., 2016; HAUSER-DAVIS et al., 2014, 2016; RODRÍGUEZ-CEA et al., 2006; WU; JONG; LEE, 2006). A indução da metalotioneína em relação a exposição ao cobre e a depuração ocorreu principalmente em *O. niloticus*, pois houve

um aumento desta proteína no fígado e nas brânquias. Além disso, foi possível observar uma relação desta indução com os danos oxidativos em macromoléculas como lipídeos e proteínas. Alguns estudos demonstraram que os danos provenientes da exposição a metais podem permanecer por muito tempo, principalmente devido ao potencial de bioacumulação nos tecidos dos peixes (FAZIO et al., 2014; KALAY; CANLI, 2000). E o presente estudo demonstrou a bioconcentração do cobre nas duas espécies, sendo mais pronunciada em *O. niloticus*.

A bioconcentração de agente tóxicos nos tecidos dos peixes é uma ferramenta interessante para detectar níveis de exposição no ambiente e também no laboratório (VAN DER OOST; BEYER; VERMEULEN, 2003). Sabe-se que este metal tem alto potencial de bioacumular e alterar o funcionamento de diversos processos metabólicos nos tecidos dos peixes (WHO, 1998). Por isso, é necessário compreender os níveis de exposição juntamente com avaliações mais sensíveis do metabolismo destes organismos. Por exemplo, neste trabalho observamos que o cobre bioacumulou principalmente no fígado dos peixes, sendo mais pronunciado em *O. niloticus* que acumulou mais a medida que este foi metabolizado pelo organismo, atingindo os valores de  $33,36 \pm 5,27 \mu\text{g/g}$  após 84 dias de depuração em água limpa. Diferentemente, *G. brasiliensis* não apresentou o mesmo comportamento em relação a exposição e a depuração sendo que o maior valor encontrado foi de  $2,83 \pm 0,67 \mu\text{g/g}$  após a exposição, demonstrando que as espécies utilizadas no experimento metabolizam o cobre de forma diferente. Eram esperadas concentrações mais altas de cobre no fígado pois ele é considerado o principal órgão na metabolização deste metal (OECD, 2014). No entanto, quando quantificado o mesmo elemento no músculo, concentrações mais baixas foram encontradas, conforme já havia sido descrito em trabalhos anteriores a respeito do cobre neste tecido (GROSELL; WOOD; WALSH, 2003; KALAY; CANLI, 2000).

Por ser considerada como um marcador específico para metais, a metalotioneína tem sido utilizada frequentemente para avaliar ambientes impactados por esta classe de contaminantes (CHATTERJEE et al., 2016). Ainda mais, a relação entre as metalotioneínas em peixes e a exposição ao cobre já foi descrita e atribuída ao potencial que estas proteínas possuem de se ligar a metais (DANG; ZHONG; WANG, 2009). Esta proteína pode ser induzida em diversos tipos de tecidos

diferentes, sendo o fígado o principal alvo da produção de metalotioneínas em peixes (DE BOECK et al., 2003).

Em *G. brasiliensis*, não observamos alterações na quantidade de metalotioneínas no fígado e no rim, entretanto observamos uma diminuição desta proteína após 7 dias de depuração nas brânquias, que se manteve baixo até 28 dias de depuração. Acredita-se que esta diminuição possa estar relacionada metabolização do cobre nesta espécie, pois neste mesmo período observamos um aumento da carbonilação proteica. Relacionando os dados observados para metalotioneína com a análises químicas nesta mesma espécie, vemos que os níveis de cobre não sofreram muitas alterações mesmo após a exposição. No entanto, devido ao aumento da carbonilação proteica podemos sugerir que esta espécie não apresenta um sistema eficiente para metabolizar o cobre. Diferentemente, *O. niloticus* apresentou indução da síntese de metalotioneína no fígado e nas brânquias. Foi interessante notar que o aumento desta proteína nas brânquias ocorreu logo após os 7 dias de exposição ao cobre, sofrendo uma queda após 14 dias de depuração. A brânquia é o primeiro tecido a entrar em contato com o contaminantes presentes no ambiente aquático, e a toxicidade do cobre em peixes é caracterizada por induzir muitos danos numa fase inicial, que após alguns dias são reparados (DANG; ZHONG; WANG, 2009). Este fenômeno ocorre porque este tecido apresenta alta taxa de renovação em relação aos outros e por isso tende a retomar a homeostase de forma mais rápida quando submetida a uma depuração (AHMAD et al., 2005). A concentração de metalotioneínas no fígado de *O. niloticus* esteve relacionada com a concentração de cobre neste mesmo tecido. Esta relação positiva já foi observada anteriormente em peixes expostos ao cobre (DE BOECK et al., 2003). Estudo anterior a este demonstrou que o fígado é o maior produtor de metalotioneínas em peixes e também o tecido que mais tende a bioacumular o cobre (FILIPOVIĆ; RASPOR, 2003). Quando acumulado, o cobre pode causar diversos danos nos hepatócitos como o aumento da peroxidação lipídica observado neste trabalho. Foi interessante observar que a medida que o cobre foi acumulado neste tecido também houve uma queda na carbonilação proteica, demonstrando que de certa forma, a metalotioneína está aumentando a concentração para manter a estabilidade intracelular neste tecido. Ou seja, isso demonstra que o metabolismo de cobre dependente de metalotioneínas é mais eficiente em *O. niloticus* do que em *G. brasiliensis*.

A exposição ao cobre pode induzir o dano oxidativo em macromoléculas como lipídeos e proteínas (AHMAD et al., 2005; CRAIG; WOOD; MCCLELLAND, 2007). A lipoperoxidação e a carbonilação proteica são marcadores de danos oxidativos em lipídeos e proteínas, respectivamente. Foi observado neste trabalho um aumento da lipoperoxidação em *O. niloticus* após 84 dias de depuração. Este aumento coincide com o aumento na concentração de cobre e de metalotioneínas no fígado, demonstrando que o acúmulo excessivo deste metal pode estar iniciando um processo oxidativo nos hepatócitos. O dano oxidativo em lipídeos causado pelo cobre já foi descrito em outras espécies de peixe, sendo atribuído principalmente ao mecanismo de produção de espécies reativas de oxigênio promovido por este metal (KRUMSCHNABEL et al., 2005). Em *G. brasiliensis*, houve uma diminuição da LPO após 14 dias de depuração, inclusive atingindo valores mais baixos do que os observados no controle negativo, sugerindo que o mecanismo de defesa antioxidante foi eficiente ao ponto de inibir os danos oxidativos em lipídeos. Além disso, o cobre induziu aumento da carbonilação das proteínas nas duas espécies sendo que somente em *O. niloticus* os valores voltaram ao normal após a depuração. Este tipo de alteração nas proteínas é irreversível e gera uma alteração na conformação desta macromolécula (GOPALAKRISHNAN et al., 2011). Esta alteração pode levar a uma redução da atividade catalítica nas enzimas podendo até inibir completamente o funcionamento delas (WONG et al., 2008).

Na PCA observamos a integração das respostas das metalotioneínas e danos em macromoléculas nas duas espécies (Fig. 4 e 5). Esta análise por ter como objetivo a redução da dimensionalidade dos dados, demonstrou algumas respostas semelhantes no comportamento de alguns biomarcadores. Por exemplo, nas duas espécies foi possível estabelecer uma relação entre a indução das MT no rim e os danos oxidativos em proteínas. Sabe-se que o rim é um órgão importante na excreção de resíduos provenientes do metabolismo dos peixes, e como em ambas espécies observamos um aumento na carbonilação de proteínas, é esperado que haja relação com este desbalanço na atividade renal. Outra relação importante extraída da PCA foi entre a lipoperoxidação e a MT no fígado de *O. niloticus*. Conforme foi discutido anteriormente, o aumento da concentração de cobre acumulado no fígado induziu um aumento tanto da MT quanto da LPO. Ainda sobre esta espécie, observamos que ambos componentes da PCA estiveram correlacionados com praticamente todos os

biomarcadores. Isso demonstra que todas as variáveis foram similarmente importantes no padrão de distribuição encontrado no gráfico de dispersão. Na Figura 5 é possível observar uma tendência dos indivíduos dos grupos Controle Negativo, Exposição e os primeiros grupos de depuração estarem deslocados para os quadrantes no lado direito do gráfico, enquanto que os indivíduos dos últimos tempos de depuração estão deslocados para o lado esquerdo. Isto demonstra que de certa forma, todos os biomarcadores utilizados nesta espécie reagiram de forma semelhante a depuração a longo prazo. Um padrão semelhante também pode ser observado para *G. brasiliensis*, no entanto os biomarcadores estiveram mais correlacionados ao primeiro componente da PCA.

## 5.6 CONCLUSÕES

A espécie *O. niloticus* apresentou maior indução de metalotioneínas frente a exposição ao cobre e a depuração as quais agiram de forma a proteger o fígado dos organismos do dano oxidativo em proteínas. Foi possível demonstrar que esta espécie depende da produção de metalotioneínas principalmente no fígado e nas brânquias para metabolizar o cobre, diferentemente do *G. brasiliensis* que apresentou apenas uma redução desta proteína nas brânquias. Ainda, foi possível correlacionar este metabolismo dependente de metalotioneínas à produção de danos oxidativos em macromoléculas nas duas espécies durante o período de depuração. Com isso, pode-se concluir que estas espécies embora façam parte da mesma família e apresentem comportamentos semelhantes e sobreposição de nichos, apresentam diferentes mecanismos de defesa frente a exposição ao cobre.



### **EXPOSIÇÃO PARENTAL AO COBRE: DANOS AO DNA E POSTERIOR PREJUÍZO A PROLE DE *OREOCHROMIS NILOTICUS***

Gustavo Souza Santos<sup>1</sup>, Giovano Neumann<sup>2</sup>, Cristian Zwetzch do Nascimento<sup>2</sup>,  
Cinthia Eloise Domingues<sup>3</sup>, Sandro Xavier Campos<sup>3</sup>, Robie Allan Bombardelli<sup>2</sup>,  
Marta Margarete Cestari<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Departamento de Genética, Centro Politécnico, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Brasil

<sup>2</sup> Instituto de Pesquisa em Aquicultura Ambiental, Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Toledo, Brasil

<sup>3</sup> Grupo de Pesquisa em Química Analítica Ambiental e Sanitária, Universidade Estadual de Ponta Grossa, Ponta Grossa, Brasil

## 6.1 RESUMO

Muitos xenobióticos que são despejados na natureza pelo homem apresentam potencial genotóxico e o cobre é um dos metais mais estudados em relação aos seus efeitos sobre o DNA. A relação entre a exposição aos metais e a genotoxicidade já foi bastante estudada, entretanto existe a necessidade de compreender os efeitos que o danos em células germinativas podem ter nas gerações futuras. Este trabalho objetivou avaliar os efeitos genotóxicos do cobre em machos de *O. niloticus* e relacionar estes danos com eventuais alterações na qualidade dos gametas e na geração de anormalidades na prole. Para isso, foi realizado o ensaio Cometa alcalino em tecidos alvo para avaliar os danos causados no DNA; a análise de parâmetros espermáticos para avaliar a qualidade dos gametas e a análise de anormalidades morfológicas das larvas provenientes da reprodução de machos expostos ao cobre. Os peixes foram expostos à três doses de sulfato de cobre por injeção intraperitoneal por 96h. Não foram observadas diferenças nos parâmetros espermáticos avaliados nos grupos expostos ao cobre. As três concentrações de cobre utilizadas no experimento induziram o aumento de danos no DNA dos espermatozoides. Este aumento esteve relacionado com o aumento da indução de deformidades craniofaciais nas larvas em *O. niloticus*, gerando prejuízo reprodutivo para a espécie.

## 6.2 INTRODUÇÃO

Os efeitos dos metais em organismos aquáticos foram evidenciados no início do século XX, com os relatos da toxicidade de determinados sais metálicos em peixes (THOMAS, 1915; WHITE; THOMAS, 1912), inclusive com os efeitos do cobre sendo citados nesse período. No entanto, o conhecimento a respeito do potencial genotóxico de determinados metais presentes no ambiente aquático só tiveram relevância após o desenvolvimento das principais técnicas da toxicologia genética em meados dos anos 70 (FRENZILLI; NIGRO; LYONS, 2009). Sabe-se que grande parte dos contaminantes que são despejados na natureza pelo homem apresentam potencial genotóxico (WATERS; STACK; JACKSON, 1999) causando efeitos sobre vários os compartimentos da biosfera. Quando atingem as células germinativas dos organismos, os compostos genotóxicos tem a capacidade de gerar efeitos adversos na prole, gerando prejuízo para a biodiversidade a longo prazo (DEVAUX et al., 2011). Os efeitos na prole causados ocasionado pelo dano genotóxico em células germinativas têm sido foco de diversos trabalhos recentes, pois não é um parâmetro

comumente incluído em estudos da toxicologia reprodutiva (DEVAUX et al., 2011, 2015; FERNÁNDEZ-DÍEZ et al., 2016; LACAZE et al., 2011a, 2011b; LEMOS et al., 2017; SANTOS et al., 2013a, 2013b).

O cobre é um dos metais mais estudados em relação aos seus efeitos sobre o DNA, e embora seja um micronutriente necessário em diversos processos fundamentais do funcionamento dos organismos, ele é tóxico em grandes quantidades (OECD, 2014). As principais fontes antropogênicas de exposição ao cobre são a mineração e a agricultura, embora a aplicação direta de alguns sais de cobre na água seja utilizada como algicida e fungicida (WHO, 1998). Dentre os efeitos reprodutivos que o cobre pode induzir nos organismos estão a diminuição da densidade e motilidade espermática dos machos (BOMBARDELLI et al., 2016; WANG et al., 2016), alteração nas taxas de fertilização e eclosão das larvas em peixes (BOMBARDELLI et al., 2016), transferência materna do cobre para a prole (CAZAN; KLERKS, 2014), aumento da mortalidade da prole (CAZAN; KLERKS, 2015), alterações em hormônios sexuais em fêmeas e machos (DRIESSNACK et al., 2016).

A OECD regulamentou diversos protocolos para o teste dos agentes tóxicos em relação aos danos reprodutivos e efeitos no desenvolvimento de peixes (OECD, 2013a, 2013b). Todas empregam a avaliação de anormalidades morfológicas na prole, porém, atualmente há uma tendência de estabelecimento de marcadores precoces. Por isso, existe uma demanda de estudos que correlacionem os danos no DNA de células germinativas com efeitos na prole, que tornam a avaliação de danos no DNA como um marcador de danos reprodutivos em peixes. Existem diversas formas de avaliação do potencial genotóxico dos compostos em células eucarióticas dentro da toxicologia ambiental, e o ensaio Cometa é definitivamente a mais utilizada (NERI et al., 2015). Esta técnica representa uma forma rápida, simples, barata e eficiente de avaliar danos no DNA de vários tecidos em diversos organismos (COLLINS et al., 2008). O ensaio Cometa alcalino apresenta capacidade de detectar quebras de fita simples do DNA e sítios alcali-lábeis, por isso é mais vantajoso que outras técnicas com o mesmo propósito (TICE et al., 2000).

É importante ressaltar que muitos trabalhos na última década utilizaram o ensaio cometa para avaliar danos no DNA de células somáticas em peixes, porém, os estudos em células germinativas não são realizados na mesma proporção (SPEIT; VASQUEZ; HARTMANN, 2009). A integridade do DNA espermático é um requisito

básico para o desenvolvimento embrionário normal da prole (CORTÉS-GUTIÉRREZ et al., 2014). Além disso, os machos com má qualidade do sêmen são mais propensos a apresentar uma maior porcentagem de espermatozoides com dano do DNA nuclear do que os machos com parâmetros normais do sêmen (ABAD et al., 2013). A fragmentação do DNA espermático pode influenciar a fertilização, qualidade e desenvolvimento do embrião, formação de blastocistos; além de induzir a malformações congênitas, doenças genéticas e câncer na prole (FERNANDEZ-GONZALEZ et al., 2008). Ainda sobre este tema, sabe-se que os espermatozoides apresentam um sistema de reparo do DNA deficitário em relação a outros tipos celulares, devido a liberação do citoplasma contendo maquinário enzimático importante na proteção do material genético (AITKEN; DE IULIIS, 2007).

Dentre os modelos biológicos mais utilizados em ensaios de genotoxicidade aquática estão os peixes pois são facilmente manuseados, sensíveis a variações no ambiente, e vulneráveis a exposição a diversas classes de agente tóxicos (AL-SABTI; METCALFE, 1995; AUTHMAN, 2015). A espécie *Oreochromis niloticus* é bastante utilizada em experimentos, sendo um modelo biológico na ecotoxicologia. Esta espécie foi introduzida em diversos países tropicais e subtropicais para fins comerciais, visto que apresenta um crescimento relativamente rápido e boa reprodução em cativeiro (FESSEHAYE et al., 2006). Estudos com esta espécie que relacionam a contaminação por metais e a genotoxicidade são abundantes, porém, a grande maioria aborda os efeitos somente em nível individual (BARBOSA et al., 2010; ÇAVAŞ; ERGENE-GÖZÜKARA, 2003).

Por isso, este estudo tem como objetivo avaliar os efeitos genotóxicos do cobre em machos de *O. niloticus* e relacioná-los com eventuais alterações na qualidade dos gametas e a geração de anormalidades na prole. Para isso, foi realizado o ensaio cometa alcalino em tecidos alvo para avaliar os danos causados ao DNA; além das análises de parâmetros espermáticos para avaliar a qualidade dos gametas e de anormalidades morfológicas das larvas provenientes da reprodução de machos expostos ao cobre.

## 6.3 MATERIAL E MÉTODOS

### 6.3.1 Desenho experimental

O experimento foi conduzido utilizando 85 machos adultos de tilápia (*O. niloticus*) ( $26,16 \pm 1,60$  cm e  $337,17 \pm 50,00$  g (média  $\pm$  DP)) e 107 fêmeas adultas ( $25,81 \pm 1,89$  cm e  $346,05 \pm 79,00$  g (média  $\pm$  DP)). Os peixes foram mantidos separados por sexo em tanques de alvenaria ( $12,8\text{m}^3$ ) do Instituto de Pesquisa em Aquicultura Ambiental da Unioeste *campus* de Toledo, a uma densidade de estocagem de três (03) peixes/ $\text{m}^2$ , continuamente abastecidos com água do Rio Toledo ( $21,0 \pm 2,0^\circ\text{C}$ ). Os peixes foram alimentados diariamente com ração comercial, a uma taxa de alimentação de 1% do peso total dos peixes em cada tanque, utilizando ração contendo 32% de proteína bruta.

Após 30 dias de estocagem, os machos foram transferidos para o laboratório, aclimatados por 3 dias, anestesiados com benzocaína (75 mg/L), pesados e alojados individualmente em caixas de água de fibra (500 L) instalados em sistema de fluxo contínuo de água filtrada (aeração constante, fotoperíodo 12h:12h, temperatura  $27,0 \pm 1,0^\circ\text{C}$ , pH  $7,5 \pm 0,5$ , oxigênio dissolvido  $8,0 \pm 1,5$  mg/L, Amônia  $0,04 \pm 0,03$  mg/L, Nitrito  $0,0 \pm 0,0$  mg/L, Nitrato  $0,66 \pm 0,02$  mg/L). A forma de exposição escolhida para o experimento foi a injeção intraperitoneal, pois este tipo de contaminação se mostrou como rota mais efetiva na indução de dano no DNA em células espermáticas (DEVAUX et al., 2011).

As fêmeas foram transferidas para laboratório, aclimatadas, anestesiadas com benzocaína (75mg/L), pesadas e induzidas hormonalmente com HCG 5UI por grama de fêmea (SENTHILKUMARAN et al., 2002) e alojadas em tanques de alvenaria ( $2,4\text{m}^3$ ) dotados de recirculação de água, aquecimento ( $27,0 \pm 1,0^\circ\text{C}$ ) e filtros biológico e mecânico. As fêmeas foram induzidas hormonalmente em duas doses, de 10 e 90% com intervalo de 20 horas, após a segunda dose hormonal esperou-se atingir 720 horas graus. As fêmeas foram massageadas no sentido cefalocaudal para a colheita dos ovócitos (WITECK et al., 2011). Os machos foram massageados no sentido cefalocaudal após 96 horas da injeção intraperitoneal contendo sulfato de cobre. O sêmen de cada macho foi armazenado em caixa de isopor com gelo ( $12,0 \pm 1,0^\circ\text{C}$ ) para as análises no DNA e as avaliações espermáticas. Após a colheita do sêmen, foi colhido sangue dos machos previamente anestesiados com benzocaína. A colheita

de sangue se deu pela punção da veia caudal com auxílio de uma seringa (3,0 mL) heparinizada onde 1,5mL de sangue foi colhido e mantido em microtubo em caixa de isopor com gelo ( $12,0 \pm 1,0^{\circ}\text{C}$ ).

Os tratamentos aplicados foram constituídos por três doses de cobre, onde foram injetados intraperitonealmente 1,0; 2,0 e 4,0 mg de  $\text{CuSO}_4/\text{kg}$  de peixe, previamente dissolvidos em 0,5 mL de soro fisiológico/kg de peixe. Os peixes do grupo controle negativo receberam aplicação semelhante contendo somente o soro fisiológico.

### 6.3.2 Avaliação espermática

Alíquotas de sêmen também foram utilizadas para as análises espermáticas. Foram avaliados os seguintes parâmetros espermáticos: taxas de motilidade, velocidade curvilínea (VCL), velocidade média de deslocamento (VMD) e velocidade em linha reta (VLR) pelo *plugin CASA (Computer Assisted Sperm Analysis)* em *software* livre (ADAMES et al., 2015). O movimento dos espermatozoides foi avaliado a partir de 10 segundos após a ativação espermática e até 120 segundos, com intervalos de 10 segundos. Os ensaios dos parâmetros espermáticos foram realizados utilizando um desenho experimental randomizado, o qual incluiu três réplicas para cada indivíduo.

### 6.3.3 Fertilização artificial e incubação dos ovos

Os ovócitos foram coletados em placas de Petri, à temperatura ambiente ( $25^{\circ}\text{C}$ ). Após, foi realizado um *pool* de ovócitos no qual para cada unidade experimental foi utilizado 0,5mL de ovócitos (~85 ovócitos) a serem fertilizados pelo sêmen de cada um dos machos do desenho experimental. A mistura de ovócitos com sêmen foi fertilizada com 100mL de água do sistema de incubação de ovos de tilápia por três minutos. Após, os ovos foram lavados para a retirada o excesso de sêmen e incubados em incubadoras de 3,5L de volume útil com fundo cônico e recirculação de água filtrada aquecida. A incubação dos ovos durou sete dias, considerando a incubação, a eclosão e o consumo do saco vitelínico das larvas. Os embriões mortos foram retirados para evitar a contaminação por fungos. Ao final dos sete dias de incubação todas as larvas foram fixadas em formol 4% tamponado para a avaliação das anormalidades morfológicas das larvas.

#### 6.3.4 Análise dos danos no DNA do sêmen e sangue

Os danos no DNA foram quantificados por meio do ensaio Cometa (versão alcalina), segundo Singh et al. (1988) com modificações de Ramsdorf et al. (2009a). Primeiramente, 20 µL do sêmen coletado e também 50 µL do sangue coletado dos peixes foram preservados separadamente para cada macho e cada tratamento em 200 µL de soro bovino fetal (Gibco) por 24 horas segundo Ramsdorf et al. (2009b). Então, 5 µL de cada foi diluído em 120 µL de agarose de baixo ponto de fusão (Sigma) e foi espalhado em uma lâmina previamente coberta com uma camada de agarose ultrapura (Sigma). As lâminas foram colocadas em uma solução de lise (2.5 M NaCl, 100 mM EDTA, 10 mM Tris, 0.8% NaOH, 1% N-lauryl-sarcosinate, 1% Triton X-100 and 10% DMSO) a 4 °C. Após 72 horas, as lâminas foram imersas em uma solução com pH>13 (10 M NaOH, 200 mM EDTA) por 25 minutos para desnaturação do DNA. Foi realizada a eletroforese a 300 mA e 25 V por 25 minutos. As lâminas foram neutralizadas com 0,4 M Tris-HCl, fixadas em etanol absoluto por 10 minutos e coradas com brometo de etídeo 0,5 g/mL imediatamente antes da análise. Para análise dos cometas do sêmen e sangue, foi utilizado o programa Metafer CometScan modelo v.2.8.0<sup>®</sup> ajustado para a plataforma Metafer de escaneamento automatizado de lâminas produzido pela Metasystems (Altussheim, Alemanha). Os 100 cometas contabilizados por lâmina foram avaliados em relação a percentagem de DNA na cauda no sêmen e sangue.

#### 6.3.5 Taxa de eclosão e anormalidades morfológicas das larvas

As taxas de eclosão foram avaliadas pela contagem da relação de ovos que compunham a unidade experimental e a quantidade de larvas eclodidas. Das larvas anteriormente fixadas em formol 4% tamponado, foram avaliadas as taxas de anormalidades larvais pela razão da incidência de anormalidades por indivíduo pelo total de anormalidades. O período de sete dias foi escolhido para fixar as larvas pois representa o estágio no qual podemos observar a maioria das anormalidades morfológicas. As larvas foram analisadas com auxílio de um estereomicroscópio em um aumento de 20x. As anormalidades consideradas foram as seguintes: desenvolvimento atrasado (WU et al., 2010); Edema cardíaco (JEZIERSKA et al., 2000; OECD, 2013a; SANTOS et al., 2013b); Ciclopia (WU et al., 2010); Anormalidades da medula espinhal (JEZIERSKA et al., 2000; OECD, 2013a; SANTOS et al., 2013b; SORHUS et al., 2015); Deformidades craniofaciais (SANTOS et al.,

2013b; SORHUS et al., 2015); Três olhos (JEZIERSKA et al., 2000); Tamanho reduzido (JEZIERSKA et al., 2000) (Fig. 14).

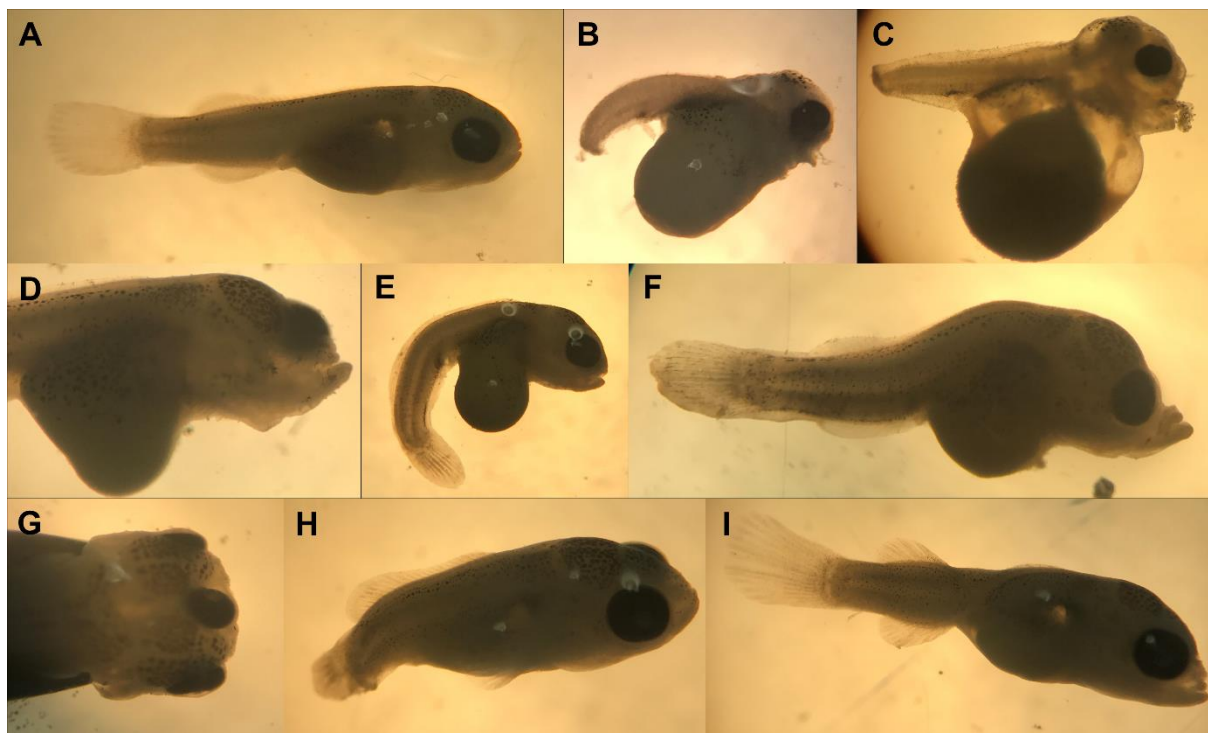


Figura 14 – Anormalidades morfológicas das larvas de *O. niloticus*. Larva normal (A); Larva com desenvolvimento atrasado (B); Edema cardíaco (C); Ciclopia (D); Anormalidades da medula espinhal (E, F, I); Deformidades craniofaciais (D, F); Três olhos (G); Tamanho reduzido (H). Fonte: O autor

#### 6.3.6 Quantificação de cobre no plasma

Foram obtidos 1,5 mL de sangue da veia caudal dos machos com o auxílio de uma seringa heparinizada. O sangue foi mantido em um microtubo no gelo durante a coleta. As amostras de sangue foram centrifugadas a 1000 xg por 10 minutos, e o plasma foi coletado para a análise de cobre. O plasma foi mantido congelado em -20°C até o período de análise. A determinação de Cu no plasma foi realizada por Espectrometria de absorção atômica (Varian®, AA 240Z) com atomização eletrotérmica em forno de grafite (modelo GTA 120) equipado com corretor transversal Zeeman para correção de fundo e amostragem automática (modelo PSD 120). 0,2 mL de plasma foram mineralizados com 5 mL de ácido nítrico 65% e 1 mL de peróxido de hidrogênio 30% em forno micro-ondas. A solução obtida foi avolumada para 15 mL com água Mili-Q (FAZIO et al., 2014; USEPA, 2007b). Todas as análises foram realizadas em triplicatas para cada um dos indivíduos. O conteúdo de Cu inorgânico do CuSO<sub>4</sub> utilizado no experimento foi de 25,4%.



### 6.3.7 Análise estatística

Todos os dados foram testados quanto a normalidade (Teste de Komogorov-Smirnov) e homocedasticidade (Teste de Bartlett). Visto que a hipótese a ser atingida neste trabalho é unicaudal, foi aplicada uma ANOVA com pós teste de Dunnett a fim de observar as diferenças significativas dos grupos expostos em relação ao controle negativo, para todas as variáveis analisadas. Os dados que não atingiram os requisitos desta análise foram submetidos ao teste não paramétrico de Kruskal-Wallis com pós teste de Dunn. O nível de significância considerado foi de  $p < 0,05$ . Os outliers foram removidos através do teste de ROUT com linha de corte em 5%.

## 6.4 RESULTADOS

### 6.4.1 Parâmetros espermáticos

Os parâmetros espermáticos de taxas de motilidade, e as velocidades espermáticas curvilinear, média de deslocamento e em linha reta não foram influenciadas ( $p > 0,05$ ) pelas doses de cobre testadas (Figura 15) em nenhum dos tempos de ativação espermática avaliados (Figura 15).

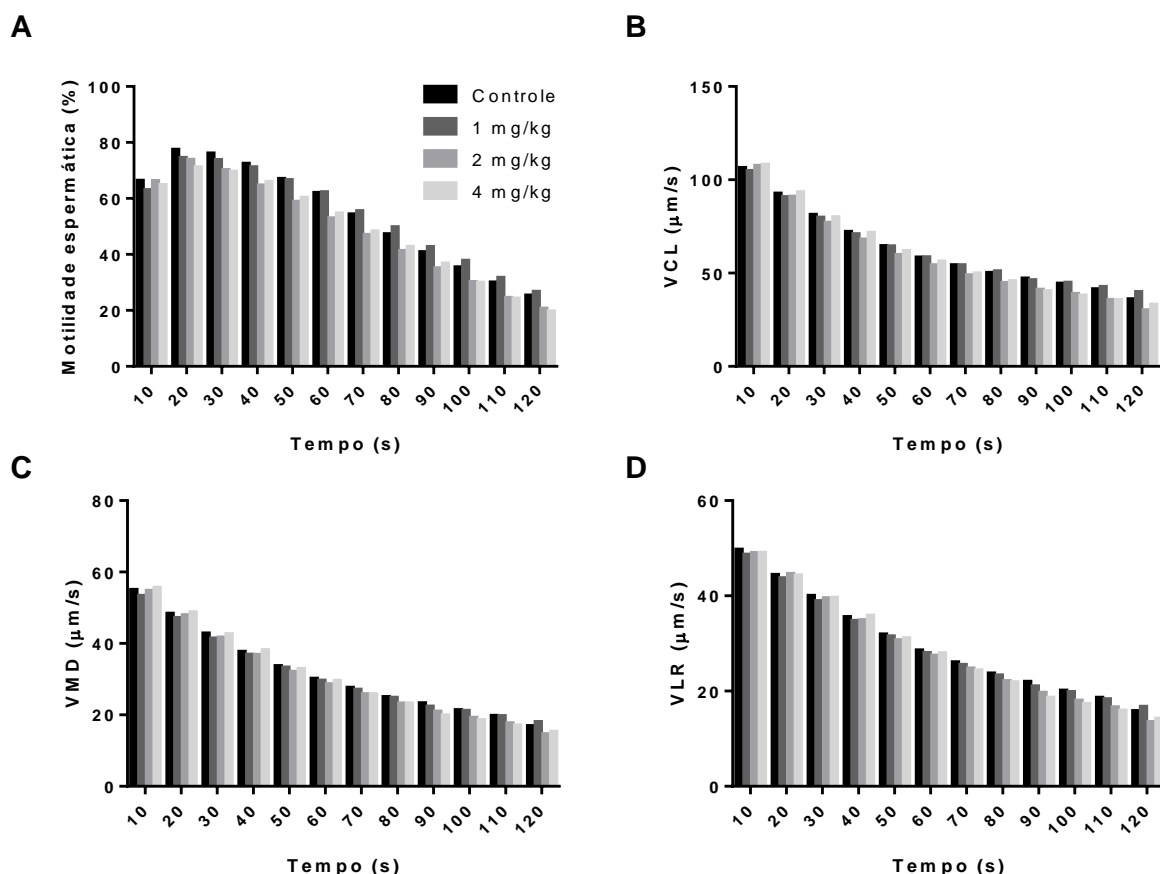


Figura 15 – Parâmetros espermáticos avaliados em *O. niloticus* expostos ao cobre. VCL=velocidade curvilinear; VMD=velocidade média de deslocamento e VLR=velocidade em linha reta. N = 85 machos. Dados expressos em médias.

#### 6.4.2 Danos ao DNA do sêmen e sangue

Os resultados demonstram um aumento significativo ( $p < 0,05$ ) nos danos ao DNA no sêmen após a injeção com as três doses de sulfato de cobre (Figura 16A). Os resultados para os danos ao DNA no sangue demonstraram que não houve diferenças significativas ( $p > 0,05$ ) entre as diferentes doses de cobre testadas e o controle negativo (Figura 16B).

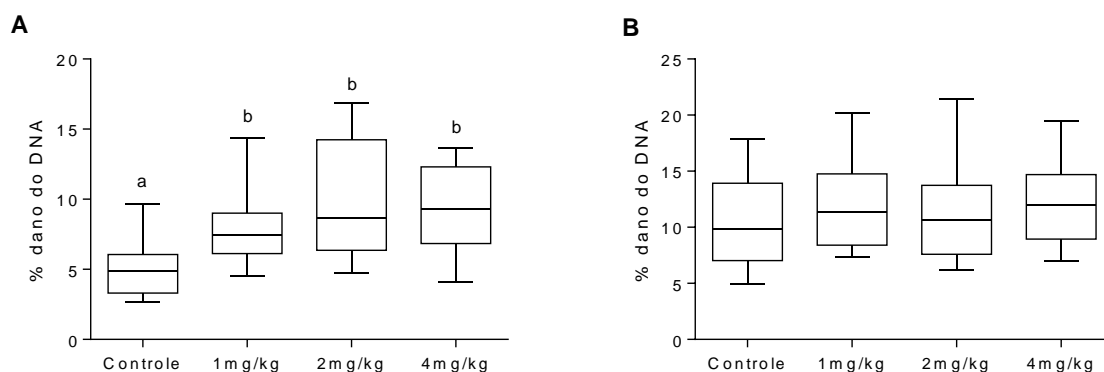


Figura 16 – Danos ao DNA em sêmen (A) e sangue (B) de *O. niloticus* expostos ao cobre por 96 horas. Letras diferentes indicam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre os grupos (a, b) pelo teste ANOVA com pós teste de Dunnett.

#### 6.4.3 Taxa de eclosão e anormalidades morfológicas das larvas

Não foram observadas diferenças significativas ( $p > 0,05$ ) nas taxas de eclosão entre o controle e as diferentes doses de cobre testadas, apresentando taxas de eclosão média de  $43,4 \pm 37,9$  %. No controle a taxa de eclosão teve média de  $20,2 \pm 22,4$ , enquanto que os peixes expostos a 1 mg/kg tiveram  $55,6 \pm 41,8$ ; na 2mg/kg tiveram  $32,3 \pm 30,7$  e na dose de 4 mg/kg tiveram  $65,6 \pm 40,1$ . Quanto às anormalidades, não foi constatado diferenças significativas ( $p > 0,05$ ) entre os grupos quando consideramos todas as anormalidades analisadas juntamente, com média de  $10,8 \pm 12,8$  %. No entanto, quando consideramos as alterações morfológicas separadamente observamos diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) no desenvolvimento atrasado e na deformidade craniofacial (Tabela 8). Foi observado aumento da ocorrência de larvas com o desenvolvimento atrasado no grupo exposto a 4 mg/kg (Tabela 8), além de um aumento das deformidades craniofaciais no grupo exposto a 2 mg/kg de cobre (Tabela 8), ambos comparados ao grupo Controle.

Tabela 8 – Taxa de anormalidades morfológicas observadas nas larvas de *O. niloticus* expostas ao cobre.

	Desenvolvimento atrasado	Edema cardíaco	Ciclopia	Anormalidade da medula espinhal	Deformidade craniofacial	Três olhos	Tamanho reduzido	Total
Controle	0,2±0,5	0±0	0±0	4,1±4,4	0±0	0±0	0±0	4,3± 4,5
1 mg/kg	0,8±0,8	0,1±0,4	0,3±0,6	6,5±8,6	0,6±1,2	0±0	0,3± 0,5	9,2± 7,4
2 mg/kg	4±6,1	0,3±0,9	2,6±5,1	1,7±3,2	3,9±5,5 *	0±0	0±0	13,2± 14,9
4 mg/kg	7,5±13,7 *	1,2±3,7	0,2±0,4	4,9±4,9	0±0	0,2± 0,4	0,4± 0,9	14,7± 18,6

Dados expressos em médias ± DP da ocorrência das anormalidades (%).

\* representa diferença significativa do grupo em relação ao grupo controle.

A partir da observação do aumento na ocorrência de larvas com o desenvolvimento atrasado e deformidades craniofaciais, estes dados foram correlacionados com o aumento de dano no DNA do sêmen. Não foi possível observar correlação significativa entre o aumento de larvas com desenvolvimento atrasado e os danos no DNA no sêmen ( $r = 0,08$ ,  $p = 0,7$ ; Fig. 17A). No entanto, observamos correlação significativa entre as variáveis quando comparamos a ocorrência das deformidades craniofaciais e os danos no DNA do sêmen ( $r = 0,42$ ,  $p = 0,035$ ; Figura 17 B).

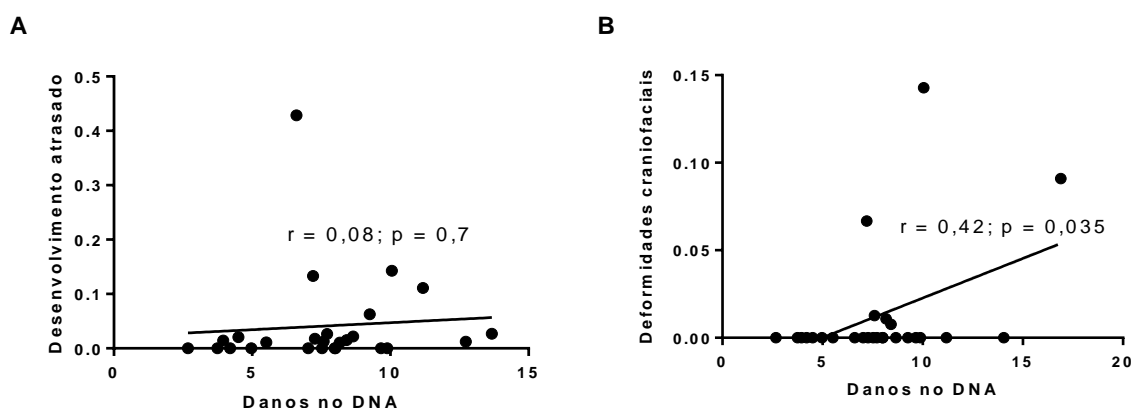


Figura 17 – Correlação entre a ocorrência de larvas com o (A) desenvolvimento atrasado e (B) deformidades craniofaciais relacionadas com os danos de DNA no sêmen de *O. niloticus* exposto ao cobre.

#### 6.4.4 Quantificação de cobre no plasma

Foram observadas diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre o grupo controle negativo e o grupo exposto a concentração nominal de 4 mg de cobre/kg de peixes em relação a concentração aferida (Tabela 9). Apesar das concentrações aferidas serem menores do que as nominais, a maior dose mostrou-se significativa em relação ao grupo Controle ( $0,28 \pm 0,35 \mu\text{g/mL}$ ).

Tabela 9 – Concentração aferida de cobre no plasma de *O. niloticus*.

	Concentração nominal (mg/kg)	Concentração aferida ( $\mu\text{g/mL}$ )
Controle	0	$0 \pm 0$
1 mg Cobre/kg	1	$0,013 \pm 0,06$
2 mg Cobre/kg	2	$0,16 \pm 0,33$
4 mg Cobre/kg	4	$0,28 \pm 0,35^*$

Dados expressos em Médias  $\pm$  DP.

\* indica diferença significativa dos grupos em relação ao controle.

#### 6.5 DISCUSSÃO

O presente trabalho mostrou como os danos provocados ao DNA pela exposição ao cobre podem estar relacionados ao prejuízo reprodutivo de *O. niloticus*, por causa do aumento de determinadas anormalidades morfológicas larvais. Os danos provocados ao DNA do sêmen dos peixes ocorreram em todas as concentrações testadas no experimento. A novidade observada neste trabalho está na forma como o cobre age sobre *O. niloticus*, pois observamos que o aumento do dano nas células germinativa dos parentais tem consequências negativas para a progênie.

Não houveram diferenças entre os grupos expostos ao cobre e o controle em relação aos parâmetros espermáticos avaliados. Portanto, podemos inferir que o cobre não interfere na viabilidade espermática de *O. niloticus* no tempo de exposição testado, ou seja, esta espécie exposta a este metal é capaz de passar o seu conteúdo genético alterado para a próxima geração. Trabalhos anteriores utilizando outras espécies mostraram resultados diferentes dos observados neste trabalho, no entanto foram utilizadas concentrações e vias de exposição diferentes (ANDERSON et al., 1991; BOMBARDELLI et al., 2016; SAROSIEK et al., 2009). Nestes trabalhos, o principal parâmetro afetado pela presença do cobre foi a motilidade espermática,

principalmente pela afinidade deste íon pela fosfatase ácida, enzima muito abundante no espermatozoide e que participa diretamente de processos relacionados ao movimento desta célula (SAROSIEK et al., 2009). No entanto, esta enzima não tem atividade em *O. niloticus* durante o período reprodutivo (verão) (PORAWSKI; WASSERMANN; ACHAVAL, 2004), justamente o período no qual foi realizado este experimento. Isto demonstra a importância do conhecimento a respeito do estado reprodutivo no qual o organismo teste se encontra, pois os efeitos podem ser variáveis em diferentes fases do ciclo reprodutivo (BOWDEN, 2008). Ainda sobre este tema, a ausência de efeito sobre os parâmetros espermáticos também induziu a uma ausência de efeito sobre a taxa de eclosão, visto que a qualidade do sêmen é fator crucial para a fertilização dos oócitos (BOBE; LABBE, 2010). Como os parâmetros espermáticos não foram afetados pela contaminação, a taxa de eclosão também não foi, embora existam estudos que incluem outros fatores importantes para o surgimento das larvas, como a qualidade dos ovos e as condições nas quais os parentais foram mantidos antes da reprodução (BOBE; LABBE, 2010). Observamos também que o tempo de atividade dos espermatozoides foi superior a 120 segundos, o que é característico da espécie, ou seja, o período no qual estas células permanecem viáveis para fertilizar os ovos é superior a 120 segundos, motivo este do tempo de fertilização ter sido fixado em 180 segundos. Os resultados apontam que até o tempo de 120 segundos a mobilidade espermática também não foi afetada pela exposição ao cobre.

O aumento nos danos no DNA do sêmen foram evidentes nos três grupos expostos ao cobre. O potencial genotóxico deste composto em peixes já foi demonstrado em vários estudos (BENINCÁ et al., 2012; ÇAVAŞ; GARANKO; ARKHIPCHUK, 2005; GABBIANELLI et al., 2003; OBIAKOR et al., 2010). No entanto, não observamos aumento deste dano quando realizamos o ensaio cometa no sangue. A via de exposição intraperitoneal faz com que o cobre tenha contato com vários órgãos, aumentando muito a capacidade de absorção pelo organismo teste. Com isso, o cobre não seguiu o forma de contato com o organismo no qual ele entra pela alimentação ou respiração para ser metabolizado no fígado (OECD, 2014). Contudo, na exposição via injeção intraperitoneal, o contaminante entra em contato rapidamente com outros órgãos, como por exemplo as gônadas. Isso pôde ser comprovado pela análise química de cobre no plasma destes peixes, na qual as concentrações aferidas foram mais baixas do que as nominais mesmo assim foi

observado um aumento do cobre no plasma dos indivíduos expostos. Em baixas concentrações, o cobre é frequentemente citado como um micronutriente essencial para o funcionamento de alguns processos celulares como a ativação da Cu/Zn superóxido dismutase, enzima que catalisa a dismutação de ânions superóxido (GABBIANELLI et al., 2003). Portanto, conhecer a concentração do cobre no tecido é fator determinante para definir se ocorrerá indução da genotoxicidade. Observamos também que a percentagem de dano basal observado no espermatozoide e no sangue foram diferentes, por exemplo, o grupo controle apresentou valores médios de 4,9 de dano no sêmen enquanto que no sangue os valores médios encontrados foram de 10,47. Isso mostra que, de certa forma, o tecido sanguíneo está mais sujeito a sofrer influência das condições externas ao organismo do que o sêmen, pois em condições naturais, o sangue é um dos tecidos que mais tem contato com os contaminantes.

O aumento da ocorrência de determinadas anormalidades morfológicas larvais após a exposição dos machos de *O. niloticus* ao cobre foi observada neste trabalho. No entanto, este aumento não ocorreu quando consideramos todos os tipos de anormalidades conjuntamente na análise. Dentre as anormalidades que tiveram aumento na ocorrência nos grupos expostos ao cobre estão as larvas com desenvolvimento atrasado e as larvas com deformidades craniofaciais. As deformidades craniofaciais foram as mais encontradas e relacionada a níveis mais elevados de danos no DNA. Durante o desenvolvimento embrionário a expressão de determinados genes como os da família *Hox*, são importantes na formação das estruturas que envolvem a caixa craniana em vertebrados (NOLTE; KRUMLAUF, 2007). Já ficou demonstrado que o cobre tem a capacidade de alterar a expressão de genes dessa família em *Danio rerio* (ZHANG et al., 2015), por isso sugere-se uma possível via de indução de anormalidades a partir dos danos no DNA. Apesar deste aumento nas anormalidades, não foram observadas alterações na taxa de eclosão como já foi previamente discutido, mostrando que a sobrevivência dos embriões não foi afetada durante os 7 dias nos quais eles permaneceram nas incubadoras. Os mecanismos de formação de anormalidades em larvas de peixes causados pela exposição a xenobióticos já foram descritos em trabalhos anteriores, tendo as alterações na integridade do DNA dos gametas como um dos fatores primordiais (DEVAUX et al., 2011, 2015, LACAZE et al., 2011a, 2011b, SANTOS et al., 2013a, 2013b). Devaux et al. (2011) testando um composto conhecidamente genotóxico

(MMS) em machos, também observou a relação entre estas duas variáveis nas espécies *Salmo trutta* e *Salvelinus alpinus*. Estas espécies apresentam um sistema de reparo de DNA semelhante a *O. niloticus* através da excisão de nucleotídeos (KIENZLER; BONY; DEVAUX, 2013). Este autor também cita a hipótese de que os oócitos das fêmeas têm capacidade de reparar parte do DNA danificado herdado dos machos contaminados. Podemos utilizar esta hipótese para explicar o motivo pelo qual não observamos um aumento significativo em todos os tipos de anormalidades larvais após a exposição ao cobre. Ainda, os valores mais altos de danos no DNA do sêmen observados neste trabalho não ultrapassaram 15%, diferentemente do trabalho de Devaux et al. (2011) que atingiu valores entre 20 e 50% de DNA fragmentado, mesmo considerando o modo de ação diferente do MMS e do cobre. Por isso, o sistema de reparo de DNA do gameta feminino pode ter protegido alguns embriões das alterações na integridade do DNA paterno que foi herdado (VOGEL; NATARAJAN, 1995).

## 6.6 CONCLUSÕES

Em conclusão, os resultados deste trabalho indicaram que o cobre induz a quebra do DNA em células germinativas dos machos de *O. niloticus* e que estes danos podem estar relacionados ao aumento de determinadas anormalidades morfológicas larvais, causando prejuízo reprodutivo para esta espécie. Este agravo reprodutivo observado pode ser considerado um risco real, visto que os parâmetros espermáticos não foram alterados pela exposição ao cobre, passando para a prole o material genético alterado. Visto que a ecotoxicologia ainda carece de estudos que façam a conexão entre os danos no DNA e o sucesso reprodutivo, este trabalho traz à tona fatos primordiais dentro desta ciência. Algumas questões permanecem em aberto em relação a este tema como por exemplo: (1) esta resposta observada no bioensaio pode ser de certa forma extrapolada para um cenário natural? (2) A prole gerada a partir destes indivíduos contaminados pode apresentar outras formas de alterações não mensurados neste trabalho? (3) Quais seriam os efeitos esperados se considerarmos também os efeitos maternos na indução de anormalidades larvais?



## 7 CONCLUSÕES GERAIS

Os resultados desta tese demonstraram que cobre pode induzir respostas biológicas distintas nas espécies *G. brasiliensis* e *O. niloticus*, ainda que ambas sejam afetadas pela exposição. Ficou demonstrado que *O. niloticus* é mais responsiva ao cobre do que *G. brasiliensis*. A tilápia ativou praticamente todos os mecanismos enzimáticos relacionados a detoxificação deste metal com o objetivo de proteger o organismo de danos provocados por esta exposição, com foi observado nas análises histopatológicas. Estes resultados podem ser como base para compreender como o cobre afeta diferentes espécies de peixe, principalmente aquelas que apresentam interações no campo, como as espécies utilizadas neste trabalho.

Os resultados ainda demonstraram como a metalotioneína é induzida em duas espécies de ciclídeos expostas ao cobre e sujeitas a vários períodos de depuração. De forma geral, a tilápia apresentou maior indução de metalotioneínas, protegendo o fígado dos organismos do dano oxidativo em proteínas. Ficou demonstrado que *O. niloticus* depende da produção de metalotioneínas principalmente no fígado e nas brânquias para metabolizar o cobre, diferentemente do *G. brasiliensis* que apresentou apenas uma redução desta proteína nas brânquias. Ainda, foi possível correlacionar este metabolismo dependente de metalotioneínas a produção de danos oxidativos em macromoléculas nas duas espécies. Com isso, concluímos que estas espécies embora façam parte da mesma família e apresentem comportamentos semelhantes e sobreposição de nichos, apresentam diferentes mecanismos para lidar com a exposição ao cobre.

Com isso, também foi demonstrado que a abordagem de multi-biomarcadores em diferentes órgãos alvo de peixes é uma ferramenta útil para avaliar tanto os efeitos provocados pela exposição quanto a depuração do cobre nas espécies estudadas. Levando em consideração os órgãos alvo avaliados, o fígado foi definitivamente o mais afetado por esta exposição, em termos da bioconcentração, indução de metalotioneínas e danos genéticos.

Foi também demonstrado a importância da aplicação de abordagens multivariadas nas respostas do biomarcadores. Esta abordagem que tem como objetivo reduzir a dimensionalidade dos dados provou ser eficiente na observação dos padrões de resposta dos biomarcadores. Desta forma, foi possível correlacionar as

respostas distintas destas espécies e tirar conclusões a respeito do estado geral dos peixes em relação a exposição ao cobre.

Adicionalmente, os resultados demonstraram como os danos no DNA provocados pela exposição ao cobre podem estar relacionados ao prejuízo reprodutivo de *O. niloticus* através do aumento de anormalidades morfológicas larvais, como as deformidades craniofaciais. O cobre induziu a quebra do DNA em células germinativas dos machos de *O. niloticus*, causando prejuízo reprodutivo para esta espécie. Além disso, foi possível concluir que esta exposição representa um risco real para esta espécie, visto que os parâmetros espermáticos não foram alterados pela exposição ao cobre, passando para a prole o conteúdo genético alterado.

## 8 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Esta tese focou esforços em explicar os mecanismos relacionados a exposição ao cobre em duas espécies de peixe. No entanto, é possível acreditar que estes resultados possam ser extrapolados para um contexto mais abrangente em relação a exposição aos xenobióticos. Levando em consideração os biomarcadores utilizados, foram obtidas respostas em níveis sub-individuais, ou seja, as avaliações consideraram alterações em níveis mais baixos de organização biológica como danos no DNA e em proteínas. Mesmo assim, se aplicado dentro de um contexto científico específico, estes biomarcadores podem ser importantes preditores das alterações em níveis mais altos de organização, como observamos nas alterações histopatológicas. Isto também ficou demonstrado no terceiro capítulo, no qual atribuímos o aumento dos danos no DNA de células germinativas a alterações na prole. Esse é um exemplo claro de como os biomarcadores podem atuar na previsão dos efeitos dos xenobióticos no meio ambiente como um todo.

Como foi descrito ao longo deste trabalho, as espécies utilizadas apresentam muitas características em comum, ambas pertencem a família Cichlidae, e apresentam comportamentos sociais e reprodutivos bem semelhantes. No entanto, em relação as respostas a exposição ao cobre, foi possível observar mecanismos completamente distintos. Desde a forma como as respostas biológicas destes peixes se alteraram em relação a exposição até a forma como cada uma respondeu tentando para eliminar o cobre. Foi possível concluir que a tilápia apresentou mais respostas em relação a depuração deste metal. Isto faz dela um bioindicador mais sensível em relação a exposição a este metal. Se retomarmos a definição de bioindicador sugerida por Markert, Breure e Zechmeister (2003) “como um organismo (ou parte de um organismo ou uma comunidade de organismos) que contém informações a respeito da qualidade do ambiente (ou parte do ambiente)” vemos que esta espécie se encaixa perfeitamente. O acará não apresentou muitas respostas específicas em relação a esta exposição, no entanto, apresentou danos da mesma maneira que a tilápia. Todavia, estas espécies interagem entre si nos ambientes aquáticos, gerando prejuízos principalmente para populações de *G. brasiliensis*, que é uma espécie nativa do Brasil. Esta situação demonstra a importância de trabalhos que comparem espécies dentro da ecotoxicologia, pois sabe-se que as respostas dos organismos

podem ser muito variáveis em relação as condições que elas vivem e que isto tem consequências diretas na conservação da biodiversidade.

Apesar do avanço considerável, a ecotoxicologia ainda carece de estudos que auxiliem a compreender melhor a relação entre as alterações que ocorrem nos organismos e as consequências para populações, comunidades e ecossistemas. É um tema complexo, mas que deve ser abordado como objetivo final da compreensão dos efeitos dos xenobióticos nas respostas dos biomarcadores. Outra questão não menos importante, e que não foi abordada nesta tese, é a extrapolação dos dados obtidos em bioensaios para o cenário natural. Este tema é um dos grandes desafios da ecotoxicologia atual e também deve direcionar os rumos desta ciência.

Parafraseando Rachel Carson “O homem é parte da natureza, e a sua guerra contra a natureza é inevitavelmente uma guerra contra a sua própria existência”, é possível refletir sobre quem é o principal causador e provável vítima da crise ambiental atual. A população em geral necessita entender que a produção de conhecimento a respeito dos possíveis efeitos causados pelos xenobióticos pode ter consequências sérias para o futuro do planeta. A compreensão destas consequências é complexa, por isso os esforços no desenvolvimento de mecanismos de divulgação científica são extremamente necessários. Para nós pesquisadores, é necessário compreender que apesar da necessidade pelo desenvolvimento de novos produtos e aplicação deles para melhorar a qualidade de vida, somos parte importante da construção deste conhecimento e por isso devemos sempre buscar ferramentas mais sustentáveis e que causem menos impactos ao meio ambiente.

## 9 REFERÊNCIAS

- ABAD, C. et al. Effects of oral antioxidant treatment upon the dynamics of human sperm DNA fragmentation and subpopulations of sperm with highly degraded DNA. **Andrologia**, v. 45, n. 3, p. 211–216, 2013.
- ABELHA, M. C. F.; GOULART, E. Oportunismo trófico de *Geophagus brasiliensis* (Quoy & Gaimard, 1824) (Osteichthyes, Cichlidae) no reservatório de Capivari, Estado do Paraná, Brasil. **Acta Scientiarum - Biological Sciences**, v. 26, n. 1, p. 37–45, 2004.
- ADAMES, M. S. et al. Optimization of the sperm: Oocyte ratio and sperm economy in the artificial reproduction of *Rhamdia quelen* using fructose as a sperm motility modulator. **Animal Reproduction Science**, v. 161, p. 119–128, 2015.
- AEBI, H. Oxygen Radicals in Biological Systems. **Methods in Enzymology**, v. 105, n. 1947, p. 121–126, 1984.
- AHMAD, I. et al. *Anguilla anguilla* L. oxidative stress biomarkers responses to copper exposure with or without  $\beta$ -naphthoflavone pre-exposure. **Chemosphere**, v. 61, n. 2, p. 267–275, 2005.
- AHMED, M. K. et al. Assessing the genotoxic potentials of arsenic in tilapia (*Oreochromis mossambicus*) using alkaline comet assay and micronucleus test. **Chemosphere**, v. 84, n. 1, p. 143–149, 2011.
- AITKEN, R. J.; DE IULIIS, G. N. Origins and consequences of DNA damage in male germ cells. **Reproductive Biomedicine Online**, v. 14, n. 6, p. 727–733, 2007.
- AKAISHI, F. M. et al. Morphological and neurotoxicological findings in tropical freshwater fish (*Astyanax* sp.) after waterborne and acute exposure to water soluble fraction (WSF) of crude oil. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 46, n. 2, p. 244–253, 2004.
- AL-AKEL, A. S. et al. Effect of cadmium on the cichlid fish, *Oreochromis niloticus* behavioural and physiological responses. **Journal of the University of Kuwait**, v. 15, p. 341–345, 1988.
- AL-GHAIS, S. M. Acetylcholinesterase, glutathione and hepatosomatic index as potential biomarkers of sewage pollution and depuration in fish. **Marine Pollution Bulletin**, v. 74, n. 1, p. 183–186, 2013.
- AL-SABTI, K.; METCALFE, C. D. Fish micronuclei for assessing genotoxicity in water. **Mutation Research/Genetic Toxicology**, v. 343, n. 2–3, p. 121–135, 1995.
- ALMEIDA, E. A. DE; DE OLIVEIRA RIBEIRO, C. A. **Pollution and Fish Health in Tropical Ecosystems**. Boca Raton: CRC Press, 2014.
- AMADOR, M. S. S. F. C.; OLIVEIRA, C. R. Lipid peroxidation acilitates aluminum accumulation in rat brain synaptosomes. **Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A**, v. 58, n. 7, p. 427–435, 1999.
- AMARAL, H. et al. Pesquisa de comparação entre a taxa de crescimento do Acará *Geophagus brasiliensis* e a Tilápia *Oreochromis niloticus* em condições de monocultivo intensivo utilizando ração e alimento vivo. **Revista Electronica de Veterinaria**, v. 12, n. 9, p. 1–22, 2011.

- ANDERSON, B. S. et al. Copper toxicity to sperm, embryos and larvae of topsmelt *Atherinops affinis*, with notes on induced spawning. **Marine Environmental Research**, v. 31, n. 1, p. 17–35, 1991.
- ANDERSON, S. et al. Genetic and molecular ecotoxicology: A research framework. **Environmental Health Perspectives**, v. 102, n. SUPPL. 12, p. 3–8, 1994.
- ATLI, G.; CANLI, M. Natural occurrence of metallothionein-like proteins in the liver of fish *Oreochromis niloticus* and effects of cadmium, lead, copper, zinc, and iron exposures on their profiles. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 70, n. 3, p. 619–627, 2003.
- AUTHMAN, M. M. Use of fish as Bio-indicator of the Effects of Heavy Metals Pollution. **Journal of Aquaculture Research & Development**, v. 6, n. 4, p. 1–13, 2015.
- AZEVEDO, J. DE S. et al. Use of *Cathorops spixii* as bioindicator of pollution of trace metals in the Santos Bay, Brazil. **Ecotoxicology**, v. 18, n. 5, p. 577–586, 2009.
- AZQUETA, A. et al. Towards a more reliable comet assay: Optimising agarose concentration, unwinding time and electrophoresis conditions. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 724, n. 1–2, p. 41–45, 2011.
- BAE, M.; PARK, Y. Biological early warning system based on the responses of aquatic organisms to disturbances: A review. **Science of The Total Environment**, v. 466–467, p. 635–649, 2014.
- BAGNASCO, M. et al. Enhanced liver metabolism of mutagens and carcinogens in fish living in polluted seawater. **Mutation Research Letters**, v. 262, n. 2, p. 129–137, 1991.
- BAINY, A. C. D. et al. Oxidative stress in gill, erythrocytes, liver and kidney of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) from a polluted site. **Aquatic Toxicology**, v. 34, n. 2, p. 151–162, 1996.
- BARBIERI, E. Effect of 2,4-D herbicide (2,4-dichlorophenoxyacetic acid) on oxygen consumption and ammonium excretion of juveniles of *Geophagus brasiliensis* (Quoy & Gaimard, 1824) (Osteichthyes, Cichlidae). **Ecotoxicology**, v. 18, n. 1, p. 55–60, 2009.
- BARBIERI, E.; FERREIRA, L. A. A. Effects of the organophosphate pesticide Folidol 600® on the freshwater fish, Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 99, n. 3, p. 209–214, 2011.
- BARBOSA, J. S. et al. Genotoxicity assessment in aquatic environment impacted by the presence of heavy metals. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 73, n. 3, p. 320–325, 2010.
- BARREIRO, E. et al. Aging, sex differences, and oxidative stress in human respiratory and limb muscles. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 41, n. 5, p. 797–809, 2006.
- BARRETO, R. E. et al. Aggressive behaviour traits predict physiological stress responses in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Marine and Freshwater Behaviour and Physiology**, v. 42, n. 2, p. 109–118, 2009.

- BEATTY, S. J. et al. The tropical south American cichlid, *Geophagus brasiliensis* in Mediterranean climatic south-western Australia. **Aquatic Invasions**, v. 8, n. 1, p. 21–36, 2013.
- BELFIORE, N. M.; ANDERSON, S. L. Effects of contaminants on genetic patterns in aquatic organisms: a review. **Mutation Research/Reviews in Genetic Toxicology**, v. 489, n. 2–3, p. 97–122, 2001.
- BENEDETTI, M.; GIULIANI, M. E.; REGOLI, F. Oxidative metabolism of chemical pollutants in marine organisms: Molecular and biochemical biomarkers in environmental toxicology. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1340, n. 1, p. 8–19, 2015.
- BENINCÁ, C. et al. Chronic genetic damages in *Geophagus brasiliensis* exposed to anthropic impact in Estuarine Lakes at Santa Catarina Coast – Southern of Brazil. **Environmental Monitoring and Assessment**, v. 184, p. 2045–2056, 2012.
- BERLETT, B. S.; STADTMAN, E. R. Protein Oxidation in Aging, Disease, and Oxidative Stress. **Journal of Biological Chemistry**, v. 272, n. 33, p. 20313–20316, 1997.
- BERNET, D. et al. Histopathology in fish: proposal for a protocol to assess aquatic pollution. **Journal of Fish Diseases**, v. 22, n. 1, p. 25–34, 1999.
- BHOWMICK, D. et al. Highly Efficient Glutathione Peroxidase and Peroxiredoxin Mimetics Protect Mammalian Cells against Oxidative Damage. **Angewandte Chemie - International Edition**, v. 54, n. 29, p. 8449–8453, 2015.
- BOBE, J.; LABBE, C. Egg and sperm quality in fish. **General and Comparative Endocrinology**, v. 165, n. 3, p. 535–548, 2010.
- BOLOGNESI, C. et al. Assessment of micronuclei induction in peripheral erythrocytes of fish exposed to xenobiotics under controlled conditions. **Aquatic Toxicology**, v. 78 Suppl 1, p. S93-S98, 2006.
- BOLOGNESI, C.; HAYASHI, M. Micronucleus assay in aquatic animals. **Mutagenesis**, v. 26, n. 1, p. 205–213, 2011.
- BOMBARDELLI, R. A. et al. Sperm motility, fertilization, and larval development of silver catfish (*Rhamdia quelen*) in copper-contaminated water. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 37, n. 3, p. 1667, 2016.
- BOONE, C. et al. **Copper Sulfate Technical Fact Sheet**. Oregon State University. Disponível em: <http://npic.orst.edu/factsheets/archive/cuso4tech.html>. Acesso em: 6 fev. 2017.
- BORCARD, D.; GILLET, F.; LEGENDRE, P. **Numerical Ecology with R**. 1 ed. New York: Springer, 2011.
- BOWDEN, T. J. Modulation of the immune system of fish by their environment. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 25, n. 4, p. 373–383, 2008.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, n. 1–2, p. 248–254, 1976.
- BURKE, D. M.; MAYER, R. T. Ethoxyresorufin: Direct Fluorimetric Assay of A

Microsomal O-Dealkylation Which Is Preferentially Inducible By 3-Methylcholanthrene. **Drug Metabolism and Disposition**, v. 2, n. February, p. 583–588, 1974.

CABI - Invasive Species Compendium. Disponível em: <<http://www.cabi.org/isc/datasheet/121012>>. Acesso em: 4 fev. 2017.

CALADO, S. L. DE M. et al. Neurotoxins in a water supply reservoir: An alert to environmental and human health. **Toxicon**, v. 126, p. 12–22, 2017.

CALZA, C. et al. Evaluation of heavy metals levels in the Paraíba do Sul River by SRTXRF in muscle, gonads and gills of *Geophagus brasiliensis*. **Radiation Physics and Chemistry**, v. 71, n. 3–4, p. 787–788, 2004.

CAMPOS-MENDOZA, A. et al. Reproductive response of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) to photoperiodic manipulation; Effects on spawning periodicity, fecundity and egg size. **Aquaculture**, v. 231, n. 1–4, p. 299–314, 2004.

CAPRA, F. **A Teia da Vida - Uma nova compreensão científica dos sistemas vivos**. 1. ed. São Paulo: Cultrix, 1997.

CARRASCO, K. R.; TILBURY, K. L.; MYERS, M. S. Assessment of the Piscine Micronucleus Test as an in situ Biological indicator of Chemical Contaminant Effects. **Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences**, v. 47, n. 11, p. 2123–2136, 1990.

CARSON, R. **Silent Spring**. 1. ed. Houghton Mifflin, 1962.

ÇAVAŞ, T.; ERGENE-GÖZÜKARA, S. Micronuclei, nuclear lesions and interphase silver-stained nucleolar organizer regions (AgNORs) as cyto-genotoxicity indicators in *Oreochromis niloticus* exposed to textile mill effluent. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 538, n. 1–2, p. 81–91, 2003.

ÇAVAŞ, T.; GARANKO, N. N.; ARKHIPCHUK, V. V. Induction of micronuclei and binuclei in blood, gill and liver cells of fishes subchronically exposed to cadmium chloride and copper sulphate. **Food and Chemical Toxicology**, v. 43, p. 569–574, 2005.

CAZAN, A. M.; KLERKS, P. L. Evidence of maternal copper and cadmium transfer in two live-bearing fish species. **Ecotoxicology**, v. 23, n. 9, p. 1774–1783, 2014.

CAZAN, A. M.; KLERKS, P. L. Effects from a short-term exposure to copper or cadmium in gravid females of the livebearer fish (*Gambusia affinis*). **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 118, p. 199–203, 2015.

CESTARI, M. M. et al. Genetic damage induced by trophic doses of lead in the neotropical fish *Hoplias malabaricus* (Characiformes, Erythrinidae) as revealed by the comet assay and chromosomal aberrations. **Genetics and Molecular Biology**, v. 27, n. 2, p. 270–274, 2004.

CETESB. **Qualidade das águas superficiais no estado de São Paulo 2014**. São Paulo: CETESB. Disponível em: <<http://www.cetesb.sp.gov.br/agua/aguas-superficiais/35-publicacoes/-relatorios>>. Acesso em: 6 fev. 2017.

CHAPMAN, P. M. Ecotoxicology and pollution key issues. **Marine Pollution Bulletin**, v. 31, n. 4–12, p. 167–177, 1995.



- CHAPMAN, P. M. Integrating toxicology and ecology: Putting the “eco” into ecotoxicology. **Marine Pollution Bulletin**, v. 44, n. 1, p. 7–15, 2002.
- CHATTERJEE, S. et al. Metal accumulation and metallothionein induction in *Oreochromis niloticus* grown in wastewater fed fishponds. **Ecological Engineering**, v. 90, n. February, p. 405–416, 2016.
- CHEN, J.-C.; LIN, C.-H. Toxicity of copper sulfate for survival, growth, molting and feeding of juveniles of the tiger shrimp, *Penaeus monodon*. **Aquaculture**, v. 192, n. 1, p. 55–65, 2001.
- CLEARWATER, S. J. et al. Comparison between the micronucleus frequencies of kidney and gill erythrocytes in tilapia fish, following mitomycin C treatment. **Aquaculture**, v. 42, n. 1, p. 39–44, 2002.
- CLEARWATER, S. J.; FARAG, A. M.; MEYER, J. S. Bioavailability and toxicity of dietborne copper and zinc to fish. **Comparative Biochemistry and Physiology - C Toxicology and Pharmacology**, v. 132, n. 3, p. 269–313, 2002.
- CLEMENTE, Z. et al. Analyses of paralytic shellfish toxins and biomarkers in a southern Brazilian reservoir. **Toxicon**, v. 55, n. 2–3, p. 396–406, 2010.
- COALE, K. H.; BRULAND, K. W. Spatial and temporal variability in copper complexation in the North Pacific. **Deep Sea Research Part A, Oceanographic Research Papers**, v. 37, n. 2, p. 317–336, 1990.
- ÇOĞUN, H. Y.; KARGIN, F. Effects of pH on the mortality and accumulation of copper in tissues of *Oreochromis niloticus*. **Chemosphere**, v. 55, p. 277–282, 2004.
- COLBORN, T.; MYERS, J. P.; DUMANOSKI, D. **Our stolen future: Are we threatening our fertility, intelligence, and survival? - A scientific detective story**. 1. ed. Dutton: Harmondsworth, 1996.
- COLLINS, A. R. et al. The comet assay: topical issues. **Mutagenesis**, v. 23, n. 3, p. 143–151, 2008.
- CORONA-RIVERA, A. et al. Protective in vivo effect of curcumin on copper genotoxicity evaluated by comet and micronucleus assays. **Journal of Applied Genetics**, v. 48, n. 4, p. 389–396, 2007.
- CORTÉS-GUTIÉRREZ, E. I. et al. Interpreting sperm DNA damage in a diverse range of mammalian sperm by means of the two-tailed comet assay. **Frontiers in Genetics**, v. 5, n. NOV, p. 1–11, 2014.
- CRAIG, P.; WOOD, C.; MCCLELLAND, G. Oxidative stress response and gene expression with acute copper exposure in zebrafish (*Danio rerio*). **American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 293, n. 5, p. R1882–1892, 2007.
- CROUCH, R. K. et al. The inhibition of islet superoxide dismutase by diabetogenic drugs. **Diabetes**, v. 30, n. 3, p. 235–241, 1981.
- D'AURIA, S. et al. Structural characterization and thermal stability of *Notothenia coriiceps* metallothionein. **The Biochemical Journal**, v. 354, n. Pt 2, p. 291–9, 2001.
- DALLINGER, R. et al. Contaminated food and uptake of heavy metals by fish: a review and a proposal for further research. **Oecologia**, v. 73, n. 1, p. 91–98, 1987.

- DANG, F.; ZHONG, H.; WANG, W. X. Copper uptake kinetics and regulation in a marine fish after waterborne copper acclimation. **Aquatic Toxicology**, v. 94, n. 3, p. 238–244, 2009.
- DARAMOLA, J. A.; OLADIMEJI, A. A. Accumulation of copper in *Clarias anguillaris* L. and *Oreochromis niloticus* L. **Water, Air, and Soil Pollution**, v. 48, n. 3–4, p. 457–461, 1989.
- DE BOECK, G. et al. Differential metallothionein induction patterns in three freshwater fish during sublethal copper exposure. **Aquatic Toxicology**, v. 65, n. 4, p. 413–424, 2003.
- DEFOREST, D. K. et al. Are ambient water quality criteria for copper protective of olfactory impairment in fish? **Integrated Environmental Assessment and Management**, v. 7, n. 1, p. 145–146, 2011.
- DEVAUX, A. et al. Reproduction impairment following paternal genotoxin exposure in brown trout (*Salmo trutta*) and Arctic charr (*Salvelinus alpinus*). **Aquatic Toxicology**, v. 101, n. 2, p. 405–11, 2011.
- DEVAUX, A. et al. Field evidence of reproduction impairment through sperm DNA damage in the fish nase (*Chondrostoma nasus*) in anthropized hydrosystems. **Aquatic Toxicology**, v. 169, p. 113–122, 2015.
- DRIESSNACK, M. K. et al. Interactive effects of chronic waterborne copper and cadmium exposure on tissue-specific metal accumulation and reproduction in fathead minnow (*Pimephales promelas*). **Comparative biochemistry and physiology. Toxicology & pharmacology : CBP**, v. 179, p. 165–73, 2016.
- ERGENE-GÖZÜKARA, S. et al. Monitoring of nuclear abnormalities in peripheral erythrocytes of three fish species from the Goksu Delta (Turkey): genotoxic damage in relation to water pollution. **Ecotoxicology**, v. 16, n. 4, p. 385–91, 2007.
- FATEHI, A. N. et al. DNA Damage in Bovine Sperm Does Not Block Fertilization and Early Embryonic Development But Induces Apoptosis After the First Cleavages. **Journal of Andrology**, v. 27, n. 2, p. 176–188, 2006.
- FAVERNEY, C. R. et al. Effects of heavy metals and 3-methylcholanthrene on expression and induction of CYP1A1 and metallothionein levels in trout (*Oncorhynchus mykiss*) hepatocyte cultures. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 19, n. 9, p. 2239–2248, 2000.
- FAZIO, F. et al. Bioaccumulation of heavy metals in blood and tissue of striped mullet in two Italian lakes. **Journal of Aquatic Animal Health**, v. 26, n. 4, p. 278–284, 2014.
- FENT, K.; STEGEMAN, J. J. Effects of tributyltin in vivo on hepatic cytochrome P450 forms in marine fish. **Aquatic Toxicology**, v. 24, p. 219–240, 1993.
- FERNÁNDEZ-DÍEZ, C. et al. Impact of sperm DNA damage and oocyte-repairing capacity on trout development. **Reproduction**, v. 152, n. 1, p. 57–67, 2016.
- FERNANDEZ-GONZALEZ, R. et al. Long-term effects of mouse intracytoplasmic sperm injection with DNA-fragmented sperm on health and behavior of adult offspring. **Biology of reproduction**, v. 78, n. 4, p. 761–772, 2008.

FERRARO, M. V. M. et al. Mutagenic effects of tributyltin and inorganic lead (Pb II) on the fish *H. malabaricus* as evaluated using the comet assay and the piscine micronucleus and chromosome aberration tests. **Genetics and Molecular Biology**, v. 27, n. 1, p. 103–107, 2004.

FESSEHAYE, Y. et al. Mating systems and male reproductive success in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) in breeding hapas: A microsatellite analysis. **Aquaculture**, v. 256, n. 1–4, p. 148–158, 2006.

FILIPOVIĆ, V.; RASPOR, B. Metallothionein and metal levels in cytosol of liver, kidney and brain in relation to growth parameters of *Mullus surmuletus* and *Liza aurata* from the Eastern Adriatic Sea. **Water Research**, v. 37, n. 13, p. 3253–3262, 2003.

FISHBASEa - *Geophagus brasiliensis*. Disponível em: <<http://www.fishbase.org/summary/4751>>. Acesso em: 4 fev. 2017.

FISHBASEb - *Oreochromis niloticus*. Disponível em: <<http://www.fishbase.org/summary/2>>. Acesso em: 4 fev. 2017.

FORBES, V. E.; PALMQVIST, A.; BACH, L. The Use and Misuse of Biomarkers in Ecotoxicology. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 25, n. 1, p. 272, 2006.

FRENZILLI, G.; NIGRO, M.; LYONS, B. P. The Comet assay for the evaluation of genotoxic impact in aquatic environments. **Mutation Research/Reviews in Genetic Toxicology**, v. 681, n. 1, p. 80–92, 2009.

GABBIANELLI, R. et al. DNA Damage Induced by Copper on Erythrocytes of Gilthead Sea Bream *Sparus aurata* and Mollusk *Scapharca inaequivalvis*. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 45, p. 350–356, 2003.

GAO, R. et al. Mechanism of pyrogallol autoxidation and determination of superoxide dismutase enzyme activity. **Bioelectrochemistry and Bioenergetics**, v. 45, n. 1, p. 41–45, 1998.

GARCIA, A. M. et al. Spatiotemporal variation in shallow-water freshwater fish distribution and abundance in a large subtropical coastal lagoon. **Environmental Biology of Fishes**, v. 68, n. 3, p. 215–228, 2003.

GEISSEN, V. et al. Emerging pollutants in the environment: A challenge for water resource management. **International Soil and Water Conservation Research**, v. 3, n. 1, p. 57–65, 2015.

GEORGOPOULOS, P. G. et al. Environmental copper: its dynamics and human exposure issues. **Journal of Toxicology and Environmental Health: Critical Reviews**, v. 4, n. 4, p. 341–394, 2001.

GHOSH, M. C.; GHOSH, R.; RAY, A. K. Impact of copper on biomonitoring enzyme ethoxyresorufin-o-deethylase in cultured catfish hepatocytes. **Environmental research**, v. 86, n. 2, p. 167–73, 2001.

GOLDMAN, B. M.; BLOBEL, G. Biogenesis of peroxisomes: intracellular site of synthesis of catalase and uricase. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 75, n. 10, p. 5066–5070, 1978.

GOMES, I. D. et al. Can fish gill anomalies be used to assess water quality in

- freshwater Neotropical systems? **Environmental Monitoring and Assessment**, v. 184, n. 9, p. 5523–5531, 2012.
- GOMIERO, L. M.; BRAGA, F. M. S. Feeding habits of the ichthyofauna in a protected area in the state of São Paulo, southeastern Brazil. **Biota Neotropica**, v. 8, n. 1, p. 41–47, 2008.
- GONZÁLEZ-MILLE, D. J. et al. Exposure to persistent organic pollutants (POPs) and DNA damage as an indicator of environmental stress in fish of different feeding habits of Coatzacoalcos, Veracruz, Mexico. **Ecotoxicology**, v. 19, n. 7, p. 1238–1248, 2010.
- GOPALAKRISHNAN, S. et al. Biochemical responses and DNA damage in red sea bream from coastal Fujian Province, China. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 74, n. 6, p. 1526–1535, 2011.
- GRISOLIA, C. K. et al. Profile of micronucleus frequencies and DNA damage in different species of fish in a eutrophic tropical lake. **Genetics and Molecular Biology**, v. 32, n. 1, p. 138–143, 2009.
- GROSELL, M. Copper. Em: WOOD, C. M.; FARREL, A. P.; BRAUNER, C. J. (Eds.). **Homeostasis and Toxicology of Essential Metals**. 1. ed. London: Elsevier, 2011. p. 54–135.
- GROSELL, M.; WOOD, C. M.; WALSH, P. J. Copper homeostasis and toxicity in the elasmobranch *Raja erinacea* and the teleost *Myoxocephalus octodecemspinosus* during exposure to elevated water-borne copper. **Comparative Biochemistry and Physiology - Part C**, v. 135, p. 179–190, 2003.
- GUILHERME, S. et al. Antioxidant and biotransformation responses in *Liza aurata* under environmental mercury exposure - relationship with mercury accumulation and implications for public health. **Marine Pollution Bulletin**, v. 56, n. 5, p. 845–59, 2008.
- GÜL, Ş. et al. Pollution correlated modifications of liver antioxidant systems and histopathology of fish (Cyprinidae) living in Seyhan Dam Lake, Turkey. **Environment International**, v. 30, n. 5, p. 605–609, 2004.
- HAMILTON, P. B. et al. Population-level consequences for wild fish exposed to sublethal concentrations of chemicals - a critical review. **Fish and Fisheries**, v. 17, n. 3, p. 545–566, 2016.
- HAMZA-CHAFFAI, A. Usefulness of Bioindicators and Biomarkers in Pollution Biomonitoring. **International Journal of Biotechnology for Wellness Industries**, v. 3, p. 19–26, 2014.
- HASSANEIN, H. M. A. et al. Induction of Hsp70 by the herbicide oxyfluorfen (goal) in the Egyptian Nile Fish, *Oreochromis niloticus*. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 37, n. 1, p. 78–84, 1999.
- HAUSER-DAVIS, R. A. et al. Bile and liver metallothionein behavior in copper-exposed fish. **Journal of Trace Elements in Medicine and Biology**, v. 28, n. 1, p. 70–74, 2014.
- HAUSER-DAVIS, R. A. et al. Cellular biomarkers of exposure and biological effect in hepatocytes of turbot (*Scophthalmus maximus*) exposed to Cd, Cu and Zn and after

- depuration. **Aquatic Toxicology**, v. 92, n. 2, p. 110–125, 2016.
- HEDDLE, J. A. A rapid *in vivo* test for chromosomal damage. **Mutation Research**, v. 18, n. 2, p. 187–190, 1973.
- HUSSEIN, S. Y.; EL-NASSER, M. A.; AHMED, S. M. Comparative studies of the effects of herbicide atrazine on freshwater fish *Oreochromis niloticus* and *Chrysichthyes auratus* at Assiut, Egypt. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 57, n. 3, p. 503–510, 1996.
- JEZIERSKA, B. et al. Malformations of newly hatched common carp larvae. **Electronic Journal of Polish Agricultural Universities**, v. 3, n. 2, p. 1–10, 2000.
- JEZIERSKA, B.; WITESKA, M. The metal uptake and accumulation in fish living in polluted waters. In: TWARDOWSKA, I. et al. (Eds.). **Soil and Water Pollution Monitoring, Protection and Remediation**. Dordrecht: Springer, 2006. p. 107–114.
- JIANG, Z. Y.; HUNT, J. V.; WOLFF, S. P. Ferrous ion oxidation in the presence of xylenol orange for detection of lipid hydroperoxide in low density lipoprotein. **Analytical Biochemistry**, v. 202, n. 2, p. 384–389, 1992.
- JOHNSON, A.; CAREW, E.; SLOMAN, K. A. The effects of copper on the morphological and functional development of zebrafish embryos. **Aquatic Toxicology**, v. 84, n. 4, p. 431–438, 2007.
- JOMOVA, K.; VALKO, M. Advances in metal-induced oxidative stress and human disease. **Toxicology**, v. 283, n. 2–3, p. 65–87, 2011.
- KALAY, M.; CANLI, M. Elimination of essential (Cu, Zn) and non-essential (Cd, Pb) metals from Tissues of a freshwater fish *Tilapia zillii*. **Turkish Journal of Zoology**, v. 24, n. December, p. 429–436, 2000.
- KAMAL, A. H. M. M.; MAIR, G. C. Salinity tolerance in superior genotypes of tilapia, *Oreochromis niloticus*, *Oreochromis mossambicus* and their hybrids. **Aquaculture**, v. 247, n. 1–4, p. 189–201, 2005.
- KEEN, J. H.; HABIG, W. H.; JAKOBY, W. B. Mechanism for several activities of the glutathione-S-transferase. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 251, n. 20, p. 6183–6188, 1976.
- KHALLAF, E. A.; ALNE-NA-EL, A. A. Feeding ecology of *Oreochromis niloticus* (Linnaeus); *Tilapia Zillii* (Gervias) in a Nile canal. **Hydrobiologia**, v. 146, n. 1, p. 57–62, 1987.
- KIENZLER, A.; BONY, S.; DEVAUX, A. DNA repair activity in fish and interest in ecotoxicology: A review. **Aquatic Toxicology**, v. 134–135, n. July 2014, p. 47–56, 2013.
- KIME, D. E. A strategy for assessing the effects of xenobiotics on fish reproduction. **Science of the Total Environment**, v. 225, n. 1–2, p. 3–11, 1999.
- KOCHER, T. D. et al. A genetic linkage map of a cichlid fish, the tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Genetics**, v. 148, n. 3, p. 1225–32, 1998.
- KRUMSCHNABEL, G. et al. Oxidative stress, mitochondrial permeability transition, and cell death in Cu-exposed trout hepatocytes. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 209, n. 1, p. 62–73, 2005.

- KRUMSCHNABEL, G.; SCHWARZBAUM, P. J.; WIESER, W. Energetics of trout hepatocytes during A23187-induced disruption of Ca<sup>2+</sup> homeostasis. **Comparative Biochemistry and Physiology - C Pharmacology Toxicology and Endocrinology**, v. 124, n. 2, p. 187–195, 1999.
- KWON, J. Y. et al. Masculinization of genetic female Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) by dietary administration of an aromatase inhibitor during sexual differentiation. **Journal of Experimental Zoology**, v. 287, n. 1, p. 46–53, 2000.
- LACAZE, E. et al. Linking genotoxic responses in *Gammarus fossarum* germ cells with reproduction impairment, using the Comet assay. **Environmental Research**, v. 111, n. 5, p. 626–634, 2011a.
- LACAZE, E. et al. DNA damage in *Gammarus fossarum* sperm as a biomarker of genotoxic pressure: Intrinsic variability and reference level. **Science of the Total Environment**, v. 409, n. 17, p. 3230–3236, 2011b.
- LAHNSTEINER, F.; MANSOUR, N.; BERGER, B. The effect of inorganic and organic pollutants on sperm motility of some freshwater teleosts. **Journal of Fish Biology**, v. 65, n. 5, p. 1283–1297, 2004.
- LANDI, S. Mammalian class theta GST and differential susceptibility to carcinogens: a review. **Mutation Research/Reviews in Mutation Research**, v. 463, n. 3, p. 247–283, 2000.
- LAWRENCE, A.; HEMINGWAY, K. **Effects of Pollution on Fish**. 1. ed. Oxford: Blackwell, 2003.
- LEMOS, J. et al. Single Low-Dose Ionizing Radiation Induces Genotoxicity in Adult Zebrafish and its Non-Irradiated Progeny. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 98, n. 2, p. 197–195, 2017.
- LEVINE, R. L. et al. Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. **Methods in Enzymology**, v. 186, n. 1983, p. 464–478, 1990.
- LINDE-ARIAS, A. R. et al. Multibiomarker approach in fish to assess the impact of pollution in a large Brazilian river, Paraíba do Sul. **Environmental Pollution**, v. 156, n. 3, p. 974–979, 2008.
- LINDE, A. R. et al. Invasive tilapia juveniles are associated with degraded river habitats. **Aquatic Conservation: Marine and Freshwater Ecosystems**, v. 18, n. 6, p. 891–895, 2008.
- LITTLE, D. C.; BHUJEL, R. C.; PHAM, T. A. Advanced nursing of mixed-sex and mono-sex tilapia (*Oreochromis niloticus*) fry, and its impact on subsequent growth in fertilized ponds. **Aquaculture**, v. 221, n. 1–4, p. 265–276, 2003.
- LUBOS, E.; LOSCALZO, J.; HANDY, D. E. Glutathione Peroxidase-1 in Health and Disease: From Molecular Mechanisms to Therapeutic Opportunities. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 15, n. 7, p. 1957–1997, 2011.
- LUOMA, S. N.; RAINBOW, P. S. Why is metal bioaccumulation so variable? Biodynamics as a unifying concept. **Environmental Science and Technology**, v. 39, n. 7, p. 1921–1931, 2005.
- MACEDA-VEIGA, A.; DE SOSTOA, A. Observational evidence of the sensitivity of

- some fish species to environmental stressors in Mediterranean rivers. **Ecological Indicators**, v. 11, n. 2, p. 311–317, 2011.
- MANSOURI, B. et al. Bioaccumulation and Depuration of Copper in the Kidney and Liver of a Freshwater Fish , *Capoeta fusca*. **Iranian Journal of Toxicology**, v. 7, n. 20, p. 816–822, 2013.
- MARDINI, C. V. **Desova em confinamento do cará-manteiga, *Geophagus brasiliensis* (Quoy & Gaimard, 1824) e comentários sobre a espécie**. Porto Alegre: Secretaria de Agricultura do Rio Grande do Sul. 8p. 1983.
- MARKERT, B. A.; BREURE, A. M.; ZECHMEISTER, H. G. **Bioindicators & Biomonitoring**. Amsterdam: Elsevier, 2003.
- MARTÍN-DÍAZ, M. L. et al. Biomarkers as tools to assess sediment quality. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 23, n. 10–11, p. 807–818, 2004.
- MASUTTI, M. B. et al. Sensibilidade a Cobre e Cromo por *Oreochromis niloticus* e *Pistia stratiotes*. **Journal of the Brazilian Society of Ecotoxicology**, v. 1, n. 1, p. 37–42, 2006.
- MATSUMOTO, S. T. et al. Genotoxicity and mutagenicity of water contaminated with tannery effluents as evaluated by the micronucleus test and comet assay using the fish *Oreochromis niloticus* and chromosome aberrations in onion root-tips. **Genetics and Molecular Biology**, v. 29, n. 1, p. 148–158, 2006.
- MAZZONI, R.; IGLESIAS-RIOS, R. Environmentally related life history variations in *Geophagus brasiliensis*. **Journal of Fish Biology**, v. 61, n. 6, p. 1606–1618, 2002.
- MCCARTER, J. A.; ROCH, M. Chronic exposure of coho salmon to sublethal concentrations of copper-III. Kinetics of metabolism of metallothionein. **Comparative Biochemistry and Physiology. Part C, Comparative**, v. 77, n. 1, p. 83–87, 1984.
- MEAGHER, E. A.; FITZGERALD, G. A. Indices of lipid peroxidation in vivo: strengths and limitations. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 28, n. 12, p. 1745–1750, 2000.
- MEYER, J. S. et al. **Effects of Water Chemistry on Bioavailability and Toxicity of Waterborne Cadmium, Copper, Nickel, Lead, and Zinc to Freshwater Organisms**. 1 ed. Pensacola: SETAC Press, 2007.
- MONTEIRO, S. M. et al. Copper toxicity in gills of the teleost fish, *Oreochromis niloticus*: Effects in apoptosis induction and cell proliferation. **Aquatic Toxicology**, v. 94, n. 3, p. 219–228, 2009.
- MOORE, J. W.; RAMAMOORTHY, S. **Heavy Metals in Natural Waters: Applied Monitoring and Impact Assessment**. 1. ed. New York: Springer-Verlag, 1984.
- MORRISON, C. M.; MIYAKE, T.; WRIGHT, J. R. J. Histological study of the development of the embryo and early larva of *Oreochromis niloticus* (Pisces: Cichlidae). **Journal of Morphology**, v. 247, n. 2, p. 172–195, 2001.
- MYERS, M. S. et al. Toxicopathic hepatic lesions in subadult English sole (*Pleuronectes vetulus*) from Puget Sound, Washington, USA: Relationships with other biomarkers of contaminant exposure. **Marine Environmental Research**, v. 45, n. 1, p. 47–67, 1998.

NACCI, D. E.; CAYULA, S.; JACKIM, E. Detection of DNA damage in individual cells from marine organisms using the single cell gel assay. **Aquatic Toxicology**, v. 35, p. 197–210, 1996.

NERI, M. et al. Worldwide interest in the comet assay: A bibliometric study. **Mutagenesis**, v. 30, n. 1, p. 155–163, 2015.

NEWMAN, M. C. **Fundamentals of Ecotoxicology**. 4 ed. Boca Raton: CRC Press, 2015.

NICHOLLS, P. Classical catalase: Ancient and modern. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 525, n. 2, p. 95–101, 2012.

NOLTE, C.; KRUMLAUF, R. Expression of Hox Genes in the Nervous System of Vertebrates. In: **HOX Gene Expression**. New York, NY: Springer New York, 2007. p. 14–41.

NOR, Y. M. Ecotoxicity of copper to aquatic biota: A review. **Environmental Research**, v. 43, n. 1, p. 274–282, 1987.

NRIAGU, J. O. A History of Global Metal Pollution. **Science**, v. 272, n. 5259, p. 223–224, 1996.

NUNES, M. V.; ROCHA, O.; VERANI, J. R. Trophic interactions between the fish *Geophagus brasiliensis* (Cichlidae) and the benthic macroinvertebrate community. **Studies on Neotropical Fauna and Environment**, v. 49, n. 1, p. 11–17, 2014.

OBIAKOR, M. O. et al. Genotoxicology : Single and Joint Action of Copper and Zinc to *Synodontis clarias* and *Tilapia nilotica*. **Journal of Applied Science and Environmental Management**, v. 14, n. 3, p. 59–64, 2010.

OECD. **Test No. 210: Fish, Early-life Stage Toxicity Test**. OECD Publishing, 2013a.

OECD. **Test No. 236: Fish Embryo Acute Toxicity (FET) Test**. OECD Publishing, 2013b.

OECD. **Screening Information Data Set Initial Assessment Profile: Copper and Copper Compounds**. Disponível em:  
<<http://webnet.oecd.org/hpv/ui/handler.axd?id=2352A0B6-1872-4C4F-ADB9-F2782D183F92>>. Acesso em: 6 fev. 2017.

OLADIMEJI, A. A.; OFFEM, B. O. Toxicity of lead to *Clarias lazera*, *Oreochromis niloticus*, *Chironomus tentans* and *Benacus sp.* **Water, Air, and Soil Pollution**, v. 44, n. 3–4, p. 191–201, 1989.

OLIVEIRA RIBEIRO, C. A. et al. Evaluation of tributyltin subchronic effects in tropical freshwater fish (*Astyanax bimaculatus*, Linnaeus, 1758). **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 51, n. 3, p. 161–7, 2002.

ONWUMERE, B. G.; OLADIMEJI, A. A. Accumulation of metals and histopathology in *Oreochromis niloticus* exposed to treated NNPC Kaduna (Nigeria) petroleum refinery effluent. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 19, n. 2, p. 123–134, 1990.

OSÓRIO, F. H. T. et al. Water quality assessment of the Tubarão River through chemical analysis and biomarkers in the Neotropical fish *Geophagus brasiliensis*. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 21, n. 15, p. 9145–9160, 2013.



OSTRAKHOVITCH, E. A.; CHERIAN, M. G. Role of p53 and reactive oxygen species in apoptotic response to copper and zinc in epithelial breast cancer cells. **Apoptosis**, v. 10, n. 1, p. 111–121, 2005.

PAGLIA, D. E.; VALENTINE, W. N. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. **The Journal of Laboratory and Clinical Medicine**, v. 70, n. 1, p. 158–69, 1967.

PANDEY, S. et al. Biomarkers of oxidative stress: A comparative study of river Yamuna fish *Wallago attu* (Bl. & Schn.). **Science of the Total Environment**, v. 309, n. 1–3, p. 105–115, 2003.

PARENTE, T. E. M.; DE-OLIVEIRA, A. C. A. X.; PAUMGARTTEN, F. J. R. Induced cytochrome P450 1A activity in cichlid fishes from Guandu River and Jacarepaguá Lake, Rio de Janeiro, Brazil. **Environmental Pollution**, v. 152, n. 1, p. 233–238, 2008.

PELGROM, S. M. G. J. et al. Integrated physiological response of tilapia, *Oreochromis mossambicus*, to sublethal copper exposure. **Aquatic Toxicology**, v. 32, n. 4, p. 303–320, 1995.

PHAM, A. N. et al. Fenton-like copper redox chemistry revisited: Hydrogen peroxide and superoxide mediation of copper-catalyzed oxidant production. **Journal of Catalysis**, v. 301, p. 54–64, 2013.

PIANCINI, L. D. S. et al. Mesotrione herbicide promotes biochemical changes and DNA damage in two fish species. **Toxicology Reports**, v. 2, p. 1157–1163, 2015.

POMPELLA, A. et al. The changing faces of glutathione, a cellular protagonist. **Biochemical Pharmacology**, v. 66, n. 8, p. 1499–1503, 2003.

PORAWSKI, M.; WASSERMANN, G. F.; ACHAVAL, M. Localization of acid phosphatase activity in the testis of two teleostean species (*Oreochromis niloticus* and *Odontheistes perugiae*). **Brazilian Journal of Biology**, v. 64, n. 4, p. 853–858, 2004.

POURKHABBAZ, A.; ALIPOUR, H.; ZAREI, I. Bioaccumulation and Depuration Rates of Zinc by *Capoeta fusca* Under Controlled Conditions. **Water Quality, Exposure and Health**, v. 7, n. 2, p. 187–191, 2015.

PRÁ, D. et al. Genotoxicity and mutagenicity of iron and copper in mice. **BioMetals**, v. 21, n. 3, p. 289–297, 2008.

RAHMAN, M. A.; MACLEAN, N. Production of Transgenic Tilapia (*Oreochromis niloticus*) by One-Cell-Stage Microinjection. **Aquaculture**, v. 105, n. 3–4, p. 219–232, 1992.

RAMSDORF, W. A. et al. Establishment of experimental conditions for preserving samples of fish blood for analysis with both comet assay and flow cytometry. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 673, n. 1, p. 78–81, 2009a.

RAMSDORF, W. A. et al. Genotoxic evaluation of different doses of inorganic lead (PbII) in *Hoplias malabaricus*. **Environmental Monitoring and Assessment**, v. 158, n. 1–4, p. 77–85, 2009b.

- REINFELDER, J. R. et al. Trace element trophic transfer in aquatic organisms: A critique of the kinetic model approach. **Science of The Total Environment**, v. 219, n. 2–3, p. 117–135, ago. 1998.
- REYNAUD, S.; RAVETON, M.; RAVANEL, P. Interactions between immune and biotransformation systems in fish: a review. **Aquatic Toxicology**, v. 87, n. 3, p. 139–45, 2008.
- REZK, M. A. et al. Selective breeding for increased body weight in a synthetic breed of Egyptian Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*: Response to selection and genetic parameters. **Aquaculture**, v. 293, n. 3–4, p. 187–194, ago. 2009.
- RODRÍGUEZ-CEA, A. et al. Metal speciation of metallothionein in white sea catfish, *Netuma barba*, and pearl cichlid, *Geophagus brasiliensis*, by orthogonal liquid chromatography coupled to ICP-MS detection. **Talanta**, v. 69, n. 4, p. 963–969, 2006.
- ROMÃO, S. et al. Blood parameter analysis and morphological alterations as biomarkers on the health of *Hoplias malabaricus* and *Geophagus brasiliensis*. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 49, n. 3, p. 441–448, 2006.
- RUAS, C. B. G. et al. Oxidative stress biomarkers of exposure in the blood of cichlid species from a metal-contaminated river. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 71, n. 1, p. 86–93, 2008.
- SABINO, J.; CORRÊA-CASTRO, R. M. C. Alimentação, período de atividade e distribuição espacial dos peixes de um riacho da Floresta Atlântica (sudeste do Brasil). **Revista Brasileira de Biologia**, v. 50, n. 1, p. 23–36, 1990.
- SAGLAM, D.; ATLI, G.; CANLI, M. Investigations on the osmoregulation of freshwater fish (*Oreochromis niloticus*) following exposures to metals (Cd, Cu) in differing hardness. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 92, p. 79–86, 2013.
- SAKKAS, D.; ALVAREZ, J. G. Sperm DNA fragmentation: mechanisms of origin, impact on reproductive outcome, and analysis. **Fertility and Sterility**, v. 93, n. 4, p. 1027–1036, 2010.
- SANCHES, F. H. C. et al. Aggressiveness overcomes body-size effects in fights staged between invasive and native fish species with overlapping niches. **PLoS ONE**, v. 7, n. 1, 2012.
- SÁNCHEZ-CHARDI, A. et al. Haematology, genotoxicity, enzymatic activity and histopathology as biomarkers of metal pollution in the shrew *Crocidura russula*. **Environmental Pollution**, v. 156, n. 3, p. 1332–9, 2008.
- SANTOS, G. O.; FONTOURA, N. F. Dinâmica reprodutiva de *Geophagus brasiliensis* (Quoy & Gaimard, 1824), no açude Águas Belas, Viamão, Rio Grande do Sul (Teleostei - Cichlidae). **Pesquisa Agropecuária Gaúcha**, v. 6, n. 1, p. 131–144, 2000.
- SANTOS, R. et al. Parental exposure to methyl methane sulfonate of three-spined stickleback: Contribution of DNA damage in male and female germ cells to further development impairment in progeny. **Ecotoxicology**, v. 22, n. 5, p. 815–824, 2013a.
- SANTOS, R. et al. Relationship between DNA damage in sperm after ex vivo exposure and abnormal embryo development in the progeny of the three-spined

stickleback. **Reproductive Toxicology**, v. 36, p. 6–11, 2013b.

SANTOS, R. et al. An integrative approach to assess ecological risks of surface water contamination for fish populations. **Environmental Pollution**, v. 220, p. 588–596, 2017.

SAROSIEK, B. et al. The effect of copper, zinc, mercury and cadmium on some sperm enzyme activities in the common carp (*Cyprinus carpio* L.). **Reproductive Biology**, v. 9, n. 3, p. 295–301, 2009.

SCHEWE, T.; RAPOPORT, S. M.; KUHN, H. Enzymology and Physiology of Reticulocyte Lipoxygenase: Comparison with other lipoxygenases. Em: MEISTER, A. (Ed.) **Advances in Enzymology and Related Areas of Molecular Biology**. 1 ed. New Jersey: John Wiley & Sons, 1989. p. 192–272

SCHLENK, D. et al. Biomarkers. In: GIULIO, R. T. DI; HINTON, D. E. (Eds.). **The Toxicology of Fishes**. 1 ed. Boca Raton: CRC Press, 2008. p. 683–732.

SCHLENK, D.; DAVIS, K. B.; GRIFFIN, B. R. Relationship between expression of hepatic metallothionein and sublethal stress in channel catfish following acute exposure to copper sulphate. **Aquaculture**, v. 177, n. 1–4, p. 367–379, 1999.

SCHWAIGER, J. et al. The use of histopathological indicators to evaluate contaminant-related stress in fish. **Journal of Aquatic Ecosystem Stress and Recovery**, v. 6, n. 1, p. 75–86, 1997.

SEDLAK, J.; LINDSAY, R. H. Estimation of Total, Protein-Bound, and Nonprotein Sulfhydryl Groups in Tissue with Ellman's Reagent. **Analytical Biochemistry**, v. 25, p. 192–205, 1968.

SENTHILKUMARAN, B. et al. Ovarian Carbonyl Reductase-Like 20beta-Hydroxysteroid Dehydrogenase Shows Distinct Surge in Messenger RNA Expression During Natural and Gonadotropin-Induced Meiotic Maturation in Nile Tilapia. **Biology of Reproduction**, v. 67, p. 1080–1086, 2002.

SEVCIKOVA, M. et al. Biochemical, haematological and oxidative stress responses of common carp (*Cyprinus carpio* L.) after sub-chronic exposure to copper. **Veterinárni Medicína**, v. 61, n. No. 1, p. 35–50, 2016.

SFAKIANAKIS, D. G. et al. Effect of heavy metals on fish larvae deformities: A review. **Environmental Research**, v. 137, p. 246–255, 2015.

SHARIATI, F.; SHARIATI, S. Review on methods for determination of metallothioneins in aquatic organisms. **Biological Trace Element Research**, v. 141, n. 1–3, p. 340–366, 2011.

SHENG, Y. et al. Superoxide Dismutases and Superoxide Reductases. **Chemical Reviews**, v. 114, n. 7, p. 3854–3918, 2014.

SHIAU, S. Y.; NING, Y. C. Estimation of dietary copper requirements of juvenile tilapia, *Oreochromis niloticus* X *O. aureus*. **Animal Science**, v. 77, n. 2, p. 287–292, 2003.

SIMONATO, J. D. et al. Biomarkers of waterborne copper exposure in the Neotropical fish *Prochilodus lineatus*. **Aquatic Toxicology**, v. 170, p. 31–41, 2016.

SINGH, N. P. et al. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage

- in individual cells. **Experimental Cell Research**, v. 175, n. 1, p. 184–91, 1988.
- SINGHAL, S. S. et al. Antioxidant role of glutathione S-transferases: 4-Hydroxynonenal, a key molecule in stress-mediated signaling. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 289, n. 3, p. 361–370, 2015.
- ŠIROKÁ, Z.; DRASTICHOVÁ, J. Biochemical markers of aquatic environment contamination - Cytochrome P450 in fish. A review. **Acta Veterinaria Brno**, v. 73, n. 1, p. 123–132, 2004.
- SORHUS, E. et al. Unexpected interaction with dispersed crude oil droplets drives severe toxicity in atlantic haddock embryos. **PLoS ONE**, v. 10, n. 4, p. 1–21, 2015.
- SPEIT, G.; VASQUEZ, M. Z.; HARTMANN, A. The comet assay as an indicator test for germ cell genotoxicity. **Mutation Research/Reviews in Genetic Toxicology**, v. 681, n. 1, p. 3–12, 2009.
- SQUADRONE, S. et al. Heavy metals distribution in muscle, liver, kidney and gill of European catfish (*Silurus glanis*) from Italian Rivers. **Chemosphere**, v. 90, n. 2, p. 358–365, 2013.
- SRIKANTH, K. et al. Glutathione and its dependent enzymes' modulatory responses to toxic metals and metalloids in fish—a review. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 20, n. 4, p. 2133–2149, 2013.
- TERRA, B. F. et al. Heavy metal in tissues of three fish species from different trophic levels in a tropical Brazilian river. **Water, Air, and Soil Pollution**, v. 187, n. 1–4, p. 275–284, 2008.
- THOMAS, A. Effects of Certain Metallic Salts upon Fishes. **Transactions of the American Fisheries Society**, v. 44, n. 2, p. 120–124, 1915.
- TICE, R. R. et al. Single Cell Gel / Comet Assay : Guidelines for In Vitro and In Vivo Genetic Toxicology Testing. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v. 35, n. 3, p. 206–21, 2000.
- TREWAVAS, E. Generic Groupings of Tilapini Used in Aquaculture. **Aquaculture**, v. 27, p. 79–81, 1982.
- TRUHAUT, R. Ecotoxicology: Objectives, principles and perspectives. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 1, n. 2, p. 151–173, 1977.
- UREN WEBSTER, T. M. et al. Hepatic transcriptional responses to copper in the three-spined stickleback are affected by their pollution exposure history. **Aquatic Toxicology**, v. 184, p. 26–36, 2017.
- USEPA. **Aquatic life ambient freshwater quality criteria-Copper. 2007 Revision. EPA/822/R/07/001**. Washington: USEPA, 2007a, 204p.
- USEPA. **Method 3051 A - Microwave assisted acid digestion of sediments, sludges, soils, and oils**. Washington: USEPA, 2007b, 30p.
- VALAVANIDIS, A. et al. Molecular biomarkers of oxidative stress in aquatic organisms in relation to toxic environmental pollutants. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 64, n. 2, p. 178–89, 2006.
- VAN DER OOST, R.; BEYER, J.; VERMEULEN, N. P. E. Fish bioaccumulation and

biomarkers in environmental risk assessment: a review. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 13, n. 2, p. 57–149, 2003.

VAN GESTEL, C. A. M.; VAN BRUMMELEN, T. C. Incorporation of the biomarker concept in ecotoxicology calls for a redefinition of terms. **Ecotoxicology**, v. 5, n. 4, p. 217–225, 1996.

VIARENGO, A. et al. A simple Spectrophotometric Method of Metallothionein evaluation in Marine Organisms: an application to Mediterranean and Adriatic Molluscs. **Marine Environmental Research**, v. 44, n. 1, p. 69–84, 1997.

VIARENGO, A. et al. Antioxidant role of metallothioneins: a comparative overview. **Cellular and Molecular Biology**, v. 46, n. 2, p. 407–417, 2000.

VICENTE, I.; ELIAS, F.; FONSECA-ALVES. Perspectivas da produção de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) no Brasil. **Revista de Ciências Agrárias**, v. 37, n. 4, p. 392–398, 2014.

VILLENEUVE, D. L.; GARCIA-REYERO, N. Vision & strategy: Predictive ecotoxicology in the 21st century. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 30, n. 1, p. 1–8, 2011.

VISNJIC-JEFTIC, Z. et al. Heavy metal and trace element accumulation in muscle, liver and gills of the Pontic shad (*Alosa immaculata* Bennet 1835) from the Danube River (Serbia). **Microchemical Journal**, v. 95, n. 2, p. 341–344, 2010.

VOGEL, E. W.; NATARAJAN, A. T. DNA damage and repair in somatic and germ cells in vivo. **Mutation Research**, v. 330, n. 1–2, p. 183–208, 1995.

VOIGT, C. L. et al. Bioconcentration and bioaccumulation of metal in freshwater Neotropical fish *Geophagus brasiliensis*. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 22, n. 11, p. 8242–8252, 2015.

WALKER, C. **Ecotoxicology**. CRC Press: Boca Raton, 2014, 209p.

WANG, H. -W. et al. Reproductive toxicity in male mice after exposure to high molybdenum and low copper concentrations. **Toxicology and Industrial Health**, v. 32, n. 9, p. 1598–1606, 2016.

WATANABE, W. O. et al. Tilapia Production Systems in the Americas: Technological Advances, Trends, and Challenges. **Reviews in Fisheries Science**, v. 10, n. 3–4, p. 465–498, 2002.

WATERS, M. D.; STACK, H. F.; JACKSON, M. A. Genetic toxicology data in the evaluation of potential human environmental carcinogens. **Mutation Research/Reviews in Mutation Research**, v. 437, n. 1, p. 21–49, 1999.

WEBB, D.; GAGNON, M. M.; ROSE, T. Hepatic metabolism of contaminants in the terapontid fish, yellowtail trumpeter (*Amniataba caudavittata* Richardson). **Environmental Toxicology**, v. 23, n. 1, p. 68–76, 2008.

WHITE, G. F.; THOMAS, A. Studies on the absorption of metallic salts by fish in their natural habitat: I. Absorption of copper by *Fundulus heteroclitus*. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 11, p. 381–386, 1912.

WHO (WORLD HEALTH ORGANIZATION). Copper. Environmental Health Criteria 200. In: **IPCS-International Programme on Chemical Safety**. Geneva: WHO, 1998.

p. 1–159

WILHELM FILHO, D. et al. Influence of season and pollution on the antioxidant defenses of the cichlid fish acar ( *Geophagus brasiliensis* ). **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 34, n. 6, p. 719–726, 2001.

WITECK, L. et al. Sperm motility, oocyte fertilization and egg hatching on jundi catfish in cadmium contaminated water. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 40, n. 3, p. 477–481, 2011.

WONG, C. M. et al. Protein carbonylation as a novel mechanism in redox signaling. **Circulation Research**, v. 102, n. 3, p. 310–318, 2008.

WU, S. M.; JONG, K. J.; LEE, Y. J. Relationships among metallothionein, cadmium accumulation, and cadmium tolerance in three species of fish. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 76, n. 4, p. 595–600, 2006.

WU, Y. et al. Effects of silver nanoparticles on the development and histopathology biomarkers of Japanese medaka ( *Oryzias latipes* ) using the partial-life test. **Aquatic Toxicology**, v. 100, n. 2, p. 160–167, 2010.

YAMAMOTO, F. Y. et al. Bioavailability of pollutants sets risk of exposure to biota and human population in reservoirs from Iguaçu River (Southern Brazil). **Environmental Science and Pollution Research**, p. 1–18, 2016.

YU, Y. et al. Occurrence, Biological Consequences, and Human Health Relevance of Oxidative Stress-Induced DNA Damage. **Chemical Research in Toxicology**, v. 29, n. 12, p. 2008–2039, 2016.

ZENG, J. et al. Comparison of metal(loid) concentrations in water, sediments and fish from two large shallow lakes. **International Journal of Environmental Science and Technology**, v. 10, n. 6, p. 1209–1218, 2013.

ZENGEYA, T. A. et al. Ecological niche modeling of the invasive potential of Nile tilapia *Oreochromis niloticus* in African river systems: Concerns and implications for the conservation of indigenous congeners. **Biological Invasions**, v. 15, n. 7, p. 1507–1521, 2013.

ZHANG, T. et al. Transcriptional responses and mechanisms of copper-induced dysfunctional locomotor behavior in zebrafish embryos. **Toxicological Sciences**, v. 148, n. 1, p. 299–310, 2015.